



**Maria Madalena  
da Costa Sobral**

**Desenvolvimento de saladas de fruta de longa  
duração: otimização e monitorização do  
processamento térmico**







**Maria Madalena  
da Costa Sobral**

**Desenvolvimento de saladas de fruta de longa  
duração: otimização e monitorização do  
processamento térmico**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Bioquímica, ramo Bioquímica Alimentar, realizada sob orientação científica da Doutora Paula Ferreira, Investigadora Principal do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro e da Engenheira Ana Maia, responsável do departamento de Inovação e Desenvolvimento da Nutrigreen, S. A.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto CICECO-Aveiro Institute of materials (Ref. FCT UID/CTM/50011/2013), financiado por fundos nacionais através da FCT/MEC e quando aplicável cofinanciado pelo FEDER, no âmbito do Acordo de Parceria PT2020



## O júri

Presidente

Professor Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues

Professor auxiliar com agregação do departamento de Química da Universidade de Aveiro

Orientador

Doutora Paula Celeste da Silva Ferreira

Investigadora principal do departamento de Química da Universidade de Aveiro

Arguente

Miguel Ângelo Parente Ribeiro Cerqueira

Bolseiro de pós-doutoramento do Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho



## **Agradecimentos**

Quero agradecer, em primeiro lugar, à Universidade de Aveiro pela formação de qualidade que me foi proporcionada ao longo destes 5 anos.

Agradeço aos meus orientadores Doutora Paula Ferreira e Engenheira Ana Maia por toda a disponibilidade, pelo apoio prestado e ensinamento que me proporcionaram ao longo da realização desta dissertação. Quero deixar aqui um agradecimento especial à Doutora Cláudia Nunes por todo o apoio e disponibilidade demonstrada e ao professor Manuel António Coimbra pelo interesse demonstrado pelo trabalho, pela ajuda e orientação científica e pela disponibilidade do laboratório. Agradeço igualmente a todo o pessoal do QOPNA e CICECO que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto. Um muito obrigada!

À Nutrigreen devo um grande muito obrigada por me terem acolhido durante o meu estágio e me oferecido todo o material necessário e total liberdade para a realização da minha tese. Às “meninas da qualidade” - Marlita, Inês e Helena - agradeço pela amizade criada e por toda a ajuda e paciência, mas acima de tudo por me terem acolhido na vossa família Torrejana.

Obrigada a todos os meus amigos, de Barcelos e de Aveiro, pela amizade e pelas palavras de conforto prestadas ao longo deste percurso académico. A ti, Bebiana, agradeço-te a minha vida académica! Obrigada pelos almoços, pelos jantares, pelas saídas académicas, pela conversas até de madrugada, pelos ataques de riso até não aguentar de dores, por tudo!

Por fim, quero agradecer aos pilares da minha vida, que sem eles nada disto teria sido possível : mãe e pai muito obrigada por todo o vosso apoio, que mesmo ainda não sabendo realmente que curso eu estou a tirar, me incentivaram sempre a fazer o melhor de mim! Todo o meu esforço e motivação advém de vocês!

Filipe obrigada pela paciência e por ignorares o meu mau humor aos fins de semana.

Obrigada à minha restante família por terem acreditado em mim ao longo deste percurso académico.

Muito obrigada a todos!



**Palavras-chave**

Salada de fruta, Pasteurização a baixa temperatura, Embalagem ativa, Sensor de temperatura, Cristal fotônico, Nanoestruturas

**Resumo**

O desenvolvimento de uma salada de fruta fresca processada a baixa temperatura com um elevado tempo de conservação, pelo menos 3 meses, foi o objetivo deste trabalho. Neste sentido, prepararam-se 3 saladas de fruta diferentes (S1-frutos nacionais, S2-frutos tropicais e cítricos e S3-frutos vermelhos), que foram sujeitas a dois tratamentos de pasteurização diferentes (80 e 70 °C), e avaliou-se a evolução das suas propriedades físico-químicas para duas temperaturas de armazenamento (4 e 25 °C) ao longo de 98 dias. Os parâmetros físico-químicos estudados foram o pH, acidez total titulável, índice de sólidos solúveis, atividade antioxidante, teor de fenóis totais, teor de ácido ascórbico e índice de cor, sendo também realizadas análises sensoriais, microbiológicas e da composição volátil.

Os dois tratamentos de pasteurização asseguraram a inibição microbiana e a inativação das enzimas responsáveis pela alteração da textura e pela escurecimento dos frutos. A temperatura de pasteurização mais baixa mostrou ser suficiente para garantir a segurança alimentar das três saladas de fruta, a nível microbiológico, conservando as propriedades sensoriais. Verificaram-se que as propriedades físico-químicas alteraram-se ao longo do tempo de armazenamento não havendo, no entanto, diferenças significativas entre as duas temperaturas de conservação. A cor foi o parâmetro mais afetado sensorialmente em que todas as saladas, escurecendo com o armazenamento principalmente quando pasteurizadas a 80 °C e armazenadas a 25 °C. A composição volátil foi afetada pela pasteurização e pela temperatura de armazenamento, tendo as saladas de fruta menos compostos voláteis após 56 dias de armazenamento relativamente à salada de fruta fresca. Os compostos também apresentaram diferentes sensibilidades térmicas quando armazenados a 4 ou a 25 °C, a S1 e S3 perdem compostos voláteis com o armazenamento a 25 °C, enquanto a S2 diminui o seu conteúdo no armazenamento a 4 °C.

S1 teve uma classificação sensorial baixa para as duas temperaturas de armazenamento, principalmente na cor e aroma, pois teve um escurecimento acentuado e houve uma perda de compostos voláteis com alteração do seu perfil de aroma. S2 demonstrou ser a salada de fruta mais estável com menor escurecimento ao longo do armazenamento e menor quantidade de compostos marcadores das reações de Maillard, apresentando classificação positiva em todos os parâmetros sensoriais avaliados. S3 foi a mais problemática quanto à textura, devido à sensibilidade deste tipo de frutos, e à cor,

principalmente devido à presença de elevado conteúdo de antocianinas que com a pasteurização e armazenamento vão alterar a cor da salada, apresentando ainda vários fatores a melhorar.

Em resumo, S2 demonstrou ser a salada mais promissora para ser comercializada.

Sendo a temperatura e homogeneidade da pasteurização fatores importantes para a garantia da segurança alimentar das saladas de fruta, a segunda parte do trabalho consistiu no desenvolvimento de um sensor de temperatura fotónico a incorporar na película polimérica da embalagem. Com base na diferença dos índices de refração de dois materiais, utilizaram-se duas estratégias: a) síntese de nanopartículas em camadas de  $\text{SiO}_2$  e  $\text{TiO}_2$  e b) preparação de filmes em camadas utilizando  $\text{SiO}_2$  e  $\text{BaTiO}_3$ . Foram preparadas nanopartículas *core-shell* constituídas por um núcleo de  $\text{SiO}_2$  (~340 nm) com uma camada de 40 nm de  $\text{TiO}_2$ . No entanto era esperada a espessura de  $\text{TiO}_2$  de 100 nm. Para a obtenção do efeito fotónico seria necessário revestir as nanopartículas com mais camadas, intercaladas de  $\text{SiO}_2$  e  $\text{TiO}_2$ . Na síntese dos filmes em multicamada de  $\text{BaTiO}_3/\text{SiO}_2$ , foram testados diferentes métodos para a camada de  $\text{SiO}_2$ : i) nanopartículas de  $\text{SiO}_2$ ; ii) filmes densos de  $\text{SiO}_2$  e iii) poli(dimetilssiloxano). Na camada de  $\text{BaTiO}_3$  foram testados filmes porosos de  $\text{BaTiO}_3$  com diferentes espessuras (20, 150 e 300 nm). Em todos estes ensaios foram testadas duas velocidades de deposição, 45 e 96  $\text{mm} \cdot \text{min}^{-1}$ . Não foi possível obter camadas bem definidas de cada composição pelo não se conseguiu a alteração da direção do feixe luminoso com consequente aparecimento de cor. Todo este trabalho de otimização permitiu o início da síntese de um sensor de temperatura de baixo custo que garantirá a segurança alimentar por simples controlo a “olho nu”.



## Keywords

Fruit salads, Low-Temperature Pasteurization, Active Packaging, Temperature Sensor, Photonic Cristal, Nanostructures

## Abstract

The development of a fresh fruit salad processed at low temperature, with a shelf life of at least 3 months was the main goal of this work. In this sense, 3 different fruit salads were prepared (S1 – national fruits, S2 – tropical and citrus fruits and S3 – red fruits) pasteurized at two different temperatures (80 and 70 °C). The evolution of the physical-chemical properties was studied for both storage temperatures (4 and 25 °C) over 98 days. The physical-chemical parameters evaluated were: pH, titrable acidity, soluble solid content, antioxidant activity, total phenolic content, ascorbic acid content, color index and also the volatile composition. The sensorial and microbiological analysis was also performed.

Both pasteurization temperatures ensured microbial inhibition and inactivation of the responsible enzymes for the texture modifications and browning of fruits. The lowest temperature applied demonstrated to be sufficient to guarantee food safety of all three fruit salads, in a microbiological and sensorial level. The physical-chemical parameters The physical-chemical properties are changed by the storage independently of the temperature. The color was the most affected parameter in the sensorial analysis, where all three fruit salads suffered browning during storage, mostly those pasteurized at 80 °C and stored at 25 °C. The volatile composition was changed by both pasteurization and storage temperatures, having the fruit salads lower volatile compounds content after 56 days of storage comparing to the fresh fruit salads. These volatile compounds showed different thermal-sensitivity when stored at 4 or 25 °C. S1 and S3 suffer greater loss of volatile compounds when stored at 25 °C than when stored at 4 °C. S2 showed the opposite behavior.

S1 had the lowest sensorial classification for both storage temperature due to fruits browning and loss of volatile compounds. S2 is the most stable salad, with the highest color stability and the lowest Maillard markers content, having a positive classification in all sensorial parameters evaluated. S3 was the most problematic salad concerning texture due to thermal-sensitivity of these fruits. The color was also a problem as consequence of the high content of anthocyanin, which led to color changes after pasteurization and during storage.

Considering all these results, the citrus and tropical fruit salads (S2) is the best choice to go to the market.

Being the temperature and homogeneity of the pasteurization determining parameters to insure the microbiological safety of the

fruit salads, the second part of this work was devoted to the development of a photonic based temperature sensor to incorporate on the package. Based on two materials with different refraction indexes, two strategies were tested: i) synthesis of nanoparticles containing several alternating layers of  $\text{SiO}_2$  and  $\text{TiO}_2$  and ii) preparation of multilayer films using  $\text{SiO}_2$  and  $\text{BaTiO}_3$ . Core shell nanoparticles formed by a  $\text{SiO}_2$  core ( $\sim 340$  nm) coated with a layer of  $\text{TiO}_2$  ( $\sim 40$  nm) were prepared. However the  $\text{TiO}_2$  thickness expected was 100 nm. To obtain the expected photonic effect, it would be necessary to coat the nanoparticles with more layers.

To synthesize the multilayers  $\text{BaTiO}_3/\text{SiO}_2$  films, different methods were tested to perform the  $\text{SiO}_2$  layer: i) nanoparticles of  $\text{SiO}_2$ ; ii) dense films of  $\text{SiO}_2$  and iii) poly(dimethylsiloxane) layer. Porous  $\text{BaTiO}_3$  layers with different thickness (20, 150 and 300 nm) were prepared. The layers obtained for each composition did not show the expected thickness and were not well defined, and therefore the color change driven by the layers with different refraction indexes was not achieved. Nevertheless, all this optimization work opens an avenue to the development of a low cost temperature sensor capable to eye naked detection of temperature changes, contributing to insure food safety.

# Índice Geral

<b>Índice Geral.....</b>	<b>i</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>iii</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>ix</b>
<b>1 Considerações teóricas .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Os frutos.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Contextualização geral.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Bioquímica dos frutos .....</b>	<b>5</b>
1.3.1 Hidratos de Carbono .....	6
1.3.2 Ácidos orgânicos e Compostos fenólicos.....	6
1.3.3 Vitaminas, Carotenóides e Minerais .....	8
1.3.4 Compostos voláteis .....	8
<b>1.4 Amadurecimento dos frutos .....</b>	<b>11</b>
1.4.1 Ação enzimática.....	11
1.4.1.1 Enzimas envolvidas na alteração da textura e consistência .....	12
1.4.1.1.1 Polissacarídeos pécticos .....	13
1.4.1.2 Enzimas envolvidas na alteração da cor.....	14
1.4.1.2.1 Polifenol oxidase .....	14
1.4.1.2.2 Peroxidase.....	15
1.4.1.2.3 $\beta$ -glucosidase .....	16
1.4.1.3 Enzimas envolvidas na alteração do sabor - “off flavor” .....	16
1.4.1.3.1 Lipoxigenase .....	16
1.4.1.3.2 Hidroperóxido Liase .....	17
<b>1.5 Efeito do processamento na qualidade do produto .....</b>	<b>17</b>
1.5.1 Processamento térmico .....	18
1.5.1.1 Acastanhamento não enzimático.....	19
1.5.1.1.1 Reações de Maillard .....	19
1.5.1.1.2 Degradação do ácido ascórbico .....	20
1.5.2 Processamento não térmico.....	21
<b>1.6 Embalagem.....</b>	<b>23</b>
1.6.1 Embalagens ativas.....	24
1.6.2 Embalagens inteligentes.....	25
1.6.2.1 Aplicação de sensores para controlo da temperatura de pasteurização .....	26
1.6.2.1.1 Sensores termocromáticos .....	26
<b>2 Enquadramento do trabalho.....</b>	<b>33</b>
<b>3 Metodologias .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Preparação das saladas de fruta .....</b>	<b>37</b>
3.1.1 Tratamento térmico – Pasteurização.....	38
3.1.2 Análise dos parâmetros físico-químicos das saladas de fruta.....	39
3.1.3 Armazenamento .....	39
3.1.4 Periodicidade das análises.....	39
3.1.5 Tratamento das amostras .....	40
3.1.5.1 Parâmetros microbiológicos.....	40
3.1.5.1 Determinação da atividade enzimática da peroxidase (POD).....	40
3.1.5.2 Análise Sensorial .....	41
3.1.5.1 Índice de cor .....	41
3.1.5.2 Índice de Escurecimento .....	42
3.1.5.3 Determinação do pH .....	42

3.1.5.4	Determinação da acidez total titulável.....	42
3.1.5.5	Determinação do índice de sólidos solúveis.....	42
3.1.5.6	Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	42
3.1.5.7	Determinação da capacidade antioxidante .....	43
3.1.5.8	Determinação do teor de taninos hidrolisáveis.....	43
3.1.5.9	Determinação do teor de antocianinas monoméricas .....	43
3.1.5.10	Determinação do teor de ácido ascórbico .....	44
3.1.5.11	Determinação de compostos voláteis por HS-SPME-GC-MS.....	44
3.1.6	Análise estatística.....	45
<b>3.2</b>	<b>Preparação do sensor de temperatura .....</b>	<b>46</b>
3.2.1	Nanopartículas com formato <i>core-shell</i> .....	46
3.2.1.1	Síntese das nanopartículas de SiO <sub>2</sub> .....	46
3.2.1.2	Revestimento das nanopartículas de SiO <sub>2</sub> com TiO <sub>2</sub> .....	46
3.2.2	Filmes fotônicos em multicamada de TiO <sub>2</sub> /BaTiO <sub>3</sub> e SiO <sub>2</sub> .....	46
3.2.2.1	Síntese do filme de TiO <sub>2</sub> .....	46
3.2.2.2	Síntese do filme de BaTiO <sub>3</sub> (~20 nm de espessura) .....	47
3.2.2.1	Síntese do filme de BaTiO <sub>3</sub> (~150 nm e 300 nm).....	47
3.2.2.2	Síntese de nanopartículas de SiO <sub>2</sub> (~60 nm) .....	48
3.2.2.1	Síntese do filme de SiO <sub>2</sub> (~46 nm).....	48
3.2.2.2	Síntese do filme de PDMS.....	49
3.2.3	Caracterização morfológica das nanopartículas e filmes.....	49
3.2.4	Testes do efeito fotônico por espectrofotometria no visível .....	49
<b>4</b>	<b>Discussão de resultados .....</b>	<b>51</b>
4.1	Estudo da pasteurização e do armazenamento nas propriedades físico-químicas das saladas de fruta .....	53
4.1.1	Inativação de enzimas e inibição dos microrganismos.....	54
4.1.2	Análise sensorial.....	57
4.1.3	Cor .....	60
4.1.4	pH e acidez total titulável.....	67
4.1.5	Índice de sólidos solúveis.....	70
4.1.6	Teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante.....	71
4.1.7	Teor de ácido ascórbico .....	75
4.1.8	Compostos voláteis .....	78
4.1.8.1	Presença de marcadores de reação de Maillard .....	88
4.2	Desenvolvimento de um sensor de temperatura para embalagens alimentares .....	90
4.2.1	Nanopartículas com formato <i>core-shell</i> .....	91
4.2.2	Filmes fotônicos em multicamada de SiO <sub>2</sub> e TiO <sub>2</sub> .....	94
<b>5</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>111</b>
<b>6</b>	<b>Perspetivas Futuras .....</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>131</b>

## Índice de Figuras

Figura 1 – Compostos voláteis existem em diferentes frutos: pera, laranja, morango, manga, kiwi, maçã, framboesa, mirtilo, melão e uva. (36-45) .....	10
Figura 2 - Representação esquemática das reações de conversão da pectina que alteram a textura e consistência dos frutos. PME – Pectina metil-esterase; $\text{Ca}^{2+}$ - ligações cruzadas de cálcio; PG – Poligalacturonase; PL – Pectina Liase; T – Temperatura. (adaptado de Sila <i>et al</i> (51)). .....	12
Figura 3- Reações de hidroxilação e oxidação catalisadas pela enzima polifenol oxidase. ....	14
Figura 4 - Representação esquemática das Reações de Maillard. (adaptado de Van Boekel <i>et al</i> (66)). ....	19
Figura 5 - Funções básicas das embalagens convencionais e a atuação das novas embalagens: ativas e inteligentes (adaptado de Yam <i>et al</i> (76)). ....	23
Figura 6 –Transição da cor dos PDAs com a temperatura consoante o aquecimento a que são sujeitos- Reversibilidade termocromática de: a) o-AF-DA; b) m-AF-DA e c) p-AF-DA (adaptado de Wacharasindhu <i>et al</i> (80)). ....	28
Figura 7 - Incidência da luz a um determinado comprimento de onda segundo a equação de Bragg-Snell sofrendo difração ao propagar num cristal fotónico. (adaptado de Wang <i>et al</i> (84)) .....	29
Figura 8 - Fotografias dos cristais fotónicos sujeitos a diferentes tempos de exposição em ambientes ricos de $\text{NH}_3$ e $\text{HCl}$ . (93). ....	30
Figura 9 - Indicador de tempo-temperatura 3M Monitor Mark comercializado pela empresa 3M. Este ITT dá-nos a indicação do tempo a que o alimento esteve exposto a determinada temperatura, acima do limite máximo selecionado. ....	31
Figura 10 - Indicador de tempo-temperatura comercializado pela empresa Keep it. A barra preta move-se ao longo do tempo e temperatura indicando os dias de prateleiras que restam para o alimento. ....	32
Figura 11 - Gráficos das pasteurizações para a temperatura mínima de: a) 80 °C e b) 70 °C. Região a cor de rosa corresponde ao tempo a que as saladas estiveram acima da temperatura mínima estabelecida. ....	39
Figura 12 – Fotografias das três saladas de fruta (S1, S2 e S3) realizadas no âmbito deste trabalho durante o estágio na empresa Nutrigreen, S. A. após o armazenamento durante 4 meses a 4 °C. ....	53
Figura 13 - Análise sensorial das saladas S1, S2 e S3 sujeitas a pasteurizações a 80 e 70 °C e armazenadas a 4 °C durante 98 dias. ....	58
Figura 14 - Análise sensorial das saladas S1, S2 e S3 sujeitas a pasteurizações a 80 e 70 °C e armazenadas a 25 °C durante 98 dias. ....	59
Figura 15 - Índice de escurecimento (Abs 420 nm) das saladas S1, S2 e S3 submetidas às duas pasteurizações (80 e 70 °C) ao longo dos 56 dias de armazenamento, a 4 e 25 °C. ....	61
Figura 16 - Variação da cor da salada S1 pasteurizada a 80 e 70 °C e armazenada durante 56 dias a 4 e 25°C, e fotografia da salada S1 após o tempo de armazenamento após 4 meses de armazenamento a 4 °C. ....	62
Figura 18 - Variação da cor da salada S2 pasteurizada a 80 e 70 °C e armazenada durante 56 dias a 4 e 25 °C, e fotografia da salada S2 após o tempo de armazenamento após 4 meses de armazenamento a 4 °C. ....	65
Figura 19 - Variação da cor da salada S3 pasteurizada a 80 e 70 °C e armazenada durante 56 dias a 4 e 25 °C, e fotografia da salada S3 após o tempo de armazenamento após 4 meses de armazenamento a 4 °C. ....	66

Figura 20 - Variação do pH e da acidez total titulável das saladas S1, S2 e S3 submetidas às duas pasteurizações (80 e 70 °C) ao longo dos 56 dias de armazenamento, a 4 e 25 °C.....	68
Figura 21 - Variação do índice de sólidos solúveis das saladas S1, S2 e S3 submetidas às duas pasteurizações (80 e 70 °C) ao longo dos 56 dias de armazenamento, a 4 e 25 °C.....	70
Figura 22 - Variação do teor de fenóis totais e capacidade antioxidante das saladas S1, S2 e S3 submetidas às duas pasteurizações (80 e 70 °C) ao longo dos 56 dias de armazenamento, a 4 e 25 °C.....	72
Figura 23 - Variação do teor de taninos hidrolisáveis e de antocianinas monoméricas ao longo dos 56 dias de armazenamento a 4 e 25 °C nas saladas S3 (salada de frutos vermelhos). ....	75
Figura 24 - Variação do teor de ácido ascórbico das saladas S1, S2 e S3 submetidas às duas pasteurizações (80 e 70 °C) ao longo dos 56 dias de armazenamento, a 4 e 25 °C.....	76
Figura 25 - Composição volátil de S1 antes de pasteurizar (NP) e pasteurizada a 70 °C (armazenadas durante 56 dias a 4 e 25 °C). ....	79
Figura 26 - Composição volátil de S2 antes de pasteurizar (NP), pasteurizadas a 70°C e armazenadas durante 56 dias a 4 e 25 °C. Análise qualitativa dos compostos voláteis efetuada por HS-SPME-GC-MS ( uma réplica). ....	83
Figura 27 - Composição volátil de S3 antes de pasteurizar (NP), pasteurizadas a 70 °C e armazenadas durante 56 dias a 4 e 25 °C. Análise qualitativa dos compostos voláteis efetuada por HS-SPME-GC-MS (uma réplica). ....	85
Figura 28 - Representação qualitativa da presença de compostos marcadores da reação de Maillard nas saladas S1, S2 e S3 sujeitas a pasteurização a 70°C e armazenadas durante 56 dias a 25°C. ....	89
Figura 29 - NPs de SiO <sub>2</sub> com diferentes tempos de reação (2 h, 4 h e 24 h) e a sua distribuição de tamanhos.....	92
Figura 30 – Micrografias de SEM das diferentes reações de síntese da capa de TiO <sub>2</sub> em volta das NPs de SiO <sub>2</sub> . Revestimento efetuado a 85°C sob refluxo de etanol: a) durante 90 minutos; b) durante 90 minutos com 3 lavagens com etanol e c) durante 24 h usando etanol seco; d) Esquema ilustrativo das NPs <i>core-shell</i> pretendidas. ....	93
Figura 31 –Micrografias de SEM dos filmes porosos de TiO <sub>2</sub> : a) T1 depositado a 45 mm.min <sup>-1</sup> ; b) T1 depositado a 96 mm.min <sup>-1</sup> ; c) T2 depositado a 45 mm.min <sup>-1</sup> ; d) T2 depositado a 96 mm.min <sup>-1</sup> e e) T3 depositado a 45 mm.min <sup>-1</sup> . ....	95
Figura 32 - Estrutura cristalina do titanato de bário a diferentes temperaturas. (adaptado de (137)). ....	97
Figura 33 - Representação esquemática esperada do filme em multicamada de BaTiO <sub>3</sub> /SiO <sub>2</sub> .....	97
Figura 34 – Microimagens de SEM dos filmes porosos de titanato de bário (BaTiO <sub>3</sub> ) (a e b), seguida de deposição de NPs de SiO <sub>2</sub> com cerca de 60 nm de diâmetro (c e d). e) Representação esquemática do filme de BaTiO <sub>3</sub> /SiO <sub>2</sub> obtido. ....	98
Figura 35 - Distribuição de tamanhos dos poros existentes nos filmes de BaTiO <sub>3</sub> e das NPs de SiO <sub>2</sub> com cerca de 60 nm de diâmetro. ....	99
Figura 36 - Representação esquemática da constituição do filme em multicamada constituído por camadas de BaTiO <sub>3</sub> intercalado com duas deposições de NPs de SiO <sub>2</sub> . ....	99
Figura 37 - Espectro de transmitância (a) e absorvância (b) de BaTiO <sub>3</sub> (~20 nm) e SiO <sub>2</sub> (60 nm, com duas deposições). ....	100

Figura 38 - Representação esquemática da constituição do filme em multicamada constituído por 5 camadas de BaTiO <sub>3</sub> intercalado com NPs de SiO <sub>2</sub> com cerca de 360 nm de diâmetro. ....	101
Figura 39 - Espectro UV/Vis da refletância do filme de BaTiO <sub>3</sub> (~100 nm) intercalado com NPs de SiO <sub>2</sub> ~360 nm. ....	102
Figura 40 – Microimagem de SEM à superfície do filme em multicamada constituído por BaTiO <sub>3</sub> (~100 nm) intercalado com NPs SiO <sub>2</sub> ~360 nm. Esquerda – filmes visualizados sem deposição de carbono; direita – filmes visualizados com uma camada de carbono depositada. ....	103
Figura 41 - Microimagem em <i>cross section</i> do filme de BaTiO <sub>3</sub> intercalado com NP SiO <sub>2</sub> com ~360 nm. ....	103
Figura 42 – Distribuição de Ba, Ti e Si ao longo do filme de BaTiO <sub>3</sub> (~100 nm) intercalado com NPs de SiO <sub>2</sub> (~360 nm) em <i>cross section</i> : a) Perfil da distribuição dos compostos inorgânicos ao longo do filme e respetivo EDS; b) mapa de elementos do filme de BaTiO <sub>3</sub> /SiO <sub>2</sub> . ....	104
Figura 43 - Representação esquemática da constituição do filme em multicamada de BaTiO <sub>3</sub> /SiO <sub>2</sub> , usando um filme de SiO <sub>2</sub> . ....	105
Figura 44 - Microimagens de SEM do filme em multicamada usando BaTiO <sub>3</sub> e SiO <sub>2</sub> . Esquerda – 45 mm.min <sup>-1</sup> (no topo, imagem à superfície, na parte inferior, imagem em <i>cross section</i> ); Direita – 96 mm.min <sup>-1</sup> (no topo, imagem à superfície, na parte inferior, imagem em <i>cross section</i> ). ....	105
Figura 45 - Distribuição de Ba, Ti e Si ao longo do filme de BaTiO <sub>3</sub> /SiO <sub>2</sub> depositado a 45 mm.min <sup>-1</sup> em <i>cross section</i> : a) Perfil da distribuição dos compostos inorgânicos ao longo do filme e respetivo EDS; b) mapa de elementos do filme de BaTiO <sub>3</sub> /SiO <sub>2</sub> . ....	107
Figura 46 - Distribuição de Ba, Ti e Si ao longo do filme de BaTiO <sub>3</sub> /SiO <sub>2</sub> depositado a 96 mm.min <sup>-1</sup> em <i>cross section</i> : a) Perfil da distribuição dos compostos inorgânicos ao longo do filme e respetivo EDS; b) mapa de elementos do filme de BaTiO <sub>3</sub> /SiO <sub>2</sub> . ....	108
Figura 47 - Estrutura do PDMS. ....	108
Figura 48 - Imagens de SEM do filme em multicamada usando BaTiO <sub>3</sub> e PDMS. Topo – imagem à superfície, Inferior – imagem em <i>cross section</i> . ....	109
Figura 49 – Mapa de distribuição de Ba, Ti e Si ao longo do filme de BaTiO <sub>3</sub> /PDMS em <i>cross section</i> . ....	110





## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Composições das saladas de fruta. ....	37
Tabela 2 - Análise microbiológica de microrganismos aeróbios (MOA), bolores e leveduras (B&L) e bactérias ácidas lácticas (BAL) das saladas de fruta (S1, S2 e S3) pasteurizadas a 70 e 80 °C e armazenadas a 4 e 25 °C .....	54
Tabela 3 - Atividade enzimática da peroxidase (POD) das saladas de fruta (S1, S2 e S3) antes da pasteurização (NP) e após a pasteurização (T0) para pasteurização a 80 e 70 °C. ....	56
Tabela 4 – Compostos voláteis presentes nas saladas S1 frescas (NP) e pasteurizadas e armazenadas durante 56 dias a 4 e 25 °C. (31, 32, 131-133).....	81
Tabela 5 - Compostos voláteis correspondentes às saladas S2 frescas (NP) e pasteurizadas e armazenadas durante 56 dias a 4 e 25 °C. ....	84
Tabela 6 - Compostos voláteis correspondentes às saladas S1 frescas (NP) e pasteurizadas e armazenadas durante 56 dias a 4 e 25 °C. (31, 32, 131-133).....	86
Tabela 7 – Constituintes dos filmes porosos de TiO <sub>2</sub> e respectivas quantidades utilizadas.....	94
Tabela 8 - Composição volátil total presente nas saladas S1 frescas (NP) e pasteurizadas e armazenadas durante 56 dias a 4 e 25 °C. Resultados expressos em área de integração - (x10 <sup>5</sup> ). ....	133
Tabela 9 - Composição volátil total presente nas saladas S2 frescas (NP) e pasteurizadas e armazenadas durante 56 dias a 4 e 25°C. Resultados expressos em área de integração - (x10 <sup>5</sup> ). ....	135
Tabela 10 - Composição volátil total presente nas saladas S3 frescas (NP) e pasteurizadas e armazenadas durante 56 dias a 4 e 25°C. Resultados expressos em área de integração - (x10 <sup>5</sup> ). ....	136
Tabela 11 - Compostos de Maillard resultantes do tratamento térmico a 70 °C efetuado às saladas S1, S2 e S3 após 56 dias de armazenamento a 4 e 25°C. HMF – 5-Hidroximetilfurfural. (1 réplica) .....	139



## Lista de Abreviaturas

AAO	Ascorbato oxidase
ABTS	Ácido-2,29-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ACC	1- Ácido - aminociclopropano-1-carboxílico
ACAC	Acetilacetato
ADH	Polipropileno anidrido modificado
AF-DA	N-(aminofenil)pentacosa-10,12-dinamida
Aw	Atividade da água
B&L	Bolores e leveduras
BAL	Bactérias ácidas lácticas
CAR	Carboxeno
CF	Cristal fotónico
DBRs	<i>Distributed bragg reflectors</i>
DCDA	Ácido 10,12-docosadinedióico
DCIP	2,6-Diclorofenolindofenol
DHAA	Desidroascorbato
DVB	Divinilbenzeno
EDS	<i>Energy dispersive spectroscopy</i>
EVOH	Co-polímero de etileno e álcool vinílico
GalA	Ácido galacturónico
GC-q-MS	Cromatografia gasosa unidimensional com detetor de espectrometria de massa
h	Hora
HMF	Hidroximetilfurfural
HPL	Hidroperóxido liase
HS-SPME	Headspace solid phase microextraction
HTST	High Temperature - Short Time
IPP	Difosfato de isopentenilo
ITT	Indicador de tempo-temperatura
LOX	Lipoxigenase
LTLT	<i>Low Temperature - Long Time</i>
M/T	Fase monoclinica/tetragonal
MOA	Microrganismos aeróbios
MRS	<i>Lactobacillus MRS brath</i> (meio enriquecido para bactérias ácidas lácticas)
NP	Salada não pasteurizada/ saladinha fresca
NPs	Nanopartículas
PDMS	Poli(dimetilssiloxano)
PCA	<i>Plate count agar</i> (meio para microrganismos aerobios)
PCDA	Ácido 10,12-pentacosadinóico
PDA	Polidiacetileno
PDMS	Dimetil polissiloxano
PET	Politereftalato de etileno
PG	Poligalacturonase

PL	Pectina Liase
PLD	Deposição a laser pulsado
PME	Pectina metilesterase
POD	Peroxidase
PP	Polipropileno
PPO	Polifenol Oxidase
PTFE	Politetrafluoretileno
RFID	Indicador de radiofrequências
RGI	Ramnogalacturonana I
S1	Salada 1
S2	Salada 2
S3	Salada 3
SAM	S-adenosil-metionina
SEM	<i>Scanning electronic microscopy</i>
T0	Dia 0, após pasteurização
T1	Filme de TiO <sub>2</sub> poroso 1
T2	Filme de TiO <sub>2</sub> poroso 2
T3	Filme de TiO <sub>2</sub> poroso 3
T28	28° dia de armazenamento após pasteurização
T56	56° dia de armazenamento após pasteurização
T98	98° dia de armazenamento após pasteurização
TEOS	Tetraetil ortosilicato
TiBuO	<i>n</i> -Butóxido de titânio
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
UFC	Unidade formadora de colônias
VO <sub>x</sub>	Óxidos de vanádio
VO <sub>2</sub>	Dióxido de vanádio
YGC	<i>Yeast extract dextrose chloranphenicol agar</i> (meio de crescimento para bolores e leveduras)

# **1 Considerações teóricas**



## **1.1 Os frutos**

Os frutos e os vegetais são alimentos essenciais numa dieta saudável, e o seu consumo diário pode ser a chave para a prevenção contra algumas doenças, como as doenças cardiovasculares e o cancro. A organização mundial de saúde recomenda o consumo mínimo diário de 400 gramas de fruta e vegetais para combater doenças como a diabetes e a obesidade, assim como os défices nutricionais, principalmente nos países pouco desenvolvidos. (1) O instituto mundial de cancro recomenda o consumo de pelo menos cinco porções de fruta e vegetais por dia. (2) Desta forma os frutos são alimentos essenciais na dieta para garantir a saúde e bem-estar das pessoas. (3)

A importância dos frutos deve-se à sua capacidade nutritiva por serem fontes de compostos bioativos, como vitaminas, minerais, fibras dietéticas, os carotenóides e os compostos fenólicos, que conferem aos frutos diversas propriedades benéficas, de entre elas a capacidade antioxidante no caso dos compostos fenólicos (4) já os compostos terpénicos, derivados maioritariamente de aminoácidos e ácidos gordos, também são conhecidos pelos seus benefícios por conferirem o sabor, o aroma e a textura desejada aos frutos. (5) A capacidade antioxidante, conferida pelos compostos fenólicos existentes nos frutos, retarda o amadurecimento destes e também, a nível da saúde, ajuda na regulação hormonal e no retardamento do envelhecimento. Contudo podem apresentar desvantagens a nível sensorial por conduzirem ao escurecimento dos frutos devido a processos de oxidação. (6, 7)

Os benefícios para a saúde associados ao consumo de frutas e produtos derivados reflete-se na elevada taxa de vendas no mercado alimentar. (3) Apesar dos frutos frescos apresentarem inúmeros benefícios, os frutos processados também não devem ser excluídos. Geralmente, as frutas processadas são menos nutritivas devido à perda de nutrientes durante o processamento térmico a que são sujeitas para inibir o crescimento microbiano e inativar as enzimas responsáveis pela sua degradação. (8)

## **1.2 Contextualização geral**

A produção e consumo de frutos e vegetais a nível mundial aumentou significativamente desde a década de 80. Esta tendência de aumento é devida ao marketing, às melhorias nas tecnologias de transporte e armazenamento e também, por parte do consumidor, pela adoção de hábitos alimentares saudáveis. (9)

O *stress* associado ao modo de vida da sociedade em que atualmente vivemos tem condicionado a necessidade de inovação e desenvolvimento de formas fáceis e rápidas de consumir alimentos. A comercialização de frutos e derivados em formato *ready to eat* traz vantagens ao consumidor podendo este economizar tempo e beneficiar de um alimento saboroso e saudável. A exigência por parte dos consumidores em consumir um produto processado, mas com as características de um alimento fresco constitui um novo desafio para o sector alimentar. Um estudo publicado pela Royal DSM, uma empresa multinacional que opera sobretudo na área da indústria química, demonstrou que 55% dos consumidores consideram um alimento “delicioso” quando este apresenta as características de um alimento fresco. Quanto questionados sobre a razão pela qual voltam a comprar produtos processados, 65% dos consumidores responderam que “o uso e preparação fácil” são a razão chave para comprarem comida pré-preparada pela segunda vez. (10) Wansink *et al* concluíram que as crianças preferem consumir fruta já cortada. (11) Estes indicaram duas razões para não consumirem fruta: as crianças mais jovens, com aparelho dentário e falta de dentes, apontaram o tamanho do fruto como um inconveniente, enquanto que as crianças mais velhas, principalmente as raparigas, apontaram como o principal fator o facto de comer os frutos em frente aos outros não ser atrativo. Os autores verificaram que o consumo de fruta aumentava cerca de 61%, quando os frutos eram previamente cortados, facilitando o seu consumo. Em ambientes escolares, a fruta é ainda servida inteira podendo este ser o motivo para a pouca adesão por parte das crianças ao consumo de fruta, atualmente. (11) Cardoso, W. S. *et al* (12) fez um estudo do mercado em Belo Horizonte (Brasil) acerca da aceitação dos consumidores relativamente ao consumo de saladas de fruta minimamente processadas (a calda foi tratada termicamente a 85 °C durante 5 min, sendo posteriormente arrefecida a 6 °C de forma a atingir a estabilidade térmica, e posterior adição às frutas). Estas apresentavam um tempo de vida de 21 dias e foram avaliadas positivamente pelos provadores. Estes aprovaram o conceito, classificaram-na como um produto ótimo e original e cerca de 71% dos provadores demonstraram interesse em se tornarem futuros consumidores. (12)

O desperdício alimentar que se verifica atualmente é outro fator a ter em consideração, principalmente nos países desenvolvidos. Estudos efetuados pela FAO estimam que o sector dos frutos e os legumes é responsável por cerca de 40-50% do desperdício anual de alimentos. As perdas de alimentos representam uma perda de



valor económico nas cadeias de produção e abastecimento de alimentos estimado em cerca de 1 bilião de euros. (13) De forma a atenuar estes desperdícios o comité de agricultura e desenvolvimento rural enunciou estratégias para tornar a cadeia alimentar mais eficiente na União Europeia. O tamanho dos frutos é considerado um dos fatores base para o elevado desperdício, pelo que esta é a razão da maioria das devoluções desnecessárias feita por parte da indústria/consumidores. (14)

A preparação de uma salada de fruta pressupõe a compra e utilização de diversos frutos. Neste ponto de vista, a preparação de uma salada de fruta individual caseira é inconcebível, já que o desperdício de fruta inerente é muito elevado pois, embora a maioria dos frutos seja vendida à unidade, para uma dose individual, não é necessário o uso de um fruto inteiro para a realização de uma salada de fruta. Por outro lado, o facto do tamanho dos frutos não ser essencial para a preparação das saladas, já que estes se encontram cortados, é uma mais valia associada à produção industrial. Assim, a salada de fruta individual, com um tempo de vida de aproximadamente 3 meses poderá vir a ajudar a contribuir significativamente na redução do desperdício alimentar de frutos que ocorre mundialmente, conferir inovação e segurança biológica no sector alimentar e, ainda, ajudar no incentivo ao consumo de fruta nas escolas.

### **1.3 Bioquímica dos frutos**

Os frutos são maioritariamente constituídos por água, podendo exceder os 95% de peso fresco. O amadurecimento dos frutos é um processo coordenado com a maturação das sementes. O processo de amadurecimento é regulado por milhares de genes que controlam o amolecimento e lenhificação das camadas do pericárpio, a acumulação de açúcares, ácidos e pigmentos e a libertação de compostos voláteis. Para além disso os frutos são uma fonte rica em nutrientes, nomeadamente minerais, vitaminas, fibras e compostos antioxidantes. Nos frutos o teor lipídico e proteico é normalmente baixo.

A qualidade do fruto é determinada pelo seu valor nutricional, sabor e tempo de vida. As maiores alterações no fruto associadas ao amadurecimento incluem: a) a cor, onde há perda do verde e aumento dos pigmentos não fotossintéticos que variam consoante a espécie; b) a firmeza, pois ocorre o amolecimento pela degradação da

parede celular; c) e o aroma devido há a produção de compostos voláteis que originam o aroma característico ao fruto. (15)

### **1.3.1 Hidratos de Carbono**

As alterações mais significativas que ocorrem a nível do metabolismo dos hidratos de carbono ocorrem na pós-colheita. (16) Nos frutos verdes, o amido é o hidrato de carbono mais abundante que vai sendo substituído pela sacarose, glucose e frutose nos frutos maduros. Apesar do amido ser maioritariamente constituído por unidades de glucose, os grânulos diferem bastante em termos de tamanhos, forma e proporção de amilose:amilopectina. A amilose consiste num polímero de glucose com ligações glicosídicas  $\alpha$ -1-4, o que a torna linear, podendo ter ramificações em  $\alpha$ -1-6 em baixa proporção. A amilopectina também é constituída por unidades de glucose, unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1-4 na proporção 94-96% de na forma linear e 4-6% de ramificações em  $\alpha$ -1-6, sendo a amilopectina a estrutura mais ramificada. (16, 17) A degradação do amido em monómeros de glucose contribui para o aparecimento dos compostos acastanhados nas saladas, devido à reação entre o grupo carbonilo da glucose e o grupo amina de um aminoácido livre. Desta reação, aliada a outras reações não enzimáticas, resultará a formação dos produtos de Amadori. Estes compostos são a primeira etapa para a formação dos polímeros acastanhados denominados de melanoidinas. (18)

### **1.3.2 Ácidos orgânicos e Compostos fenólicos**

A composição relativa e quantitativa dos ácidos orgânicos é usada como indicador de qualidade dos frutos pois estes podem afetar diretamente algumas propriedades organoléticas dos frutos, ao influenciar a estabilidade dos compostos fenólicos. A acidez dos frutos deve-se aos ácidos orgânicos existentes nos vacúolos, e a sua composição varia consoante o tipo de fruto, em que os mais imaturos têm maior quantidade de ácidos que pode diminuir durante a maturação e amadurecimento por conversão destes ácidos em açúcares pela gluconeogénese. (19)

Os ácidos orgânicos mais abundantes nos frutos são o ácido málico, existente em grande quantidade nas maçãs, e o cítrico que está presente nos citrinos. O ácido succínico encontra-se em concentrações moderadas, consoante o fruto, assim como o ácido tartárico, que se encontra nas uvas. (20)

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários importantes para o sabor e a cor dos frutos frescos e processados. Estes compostos têm diversas funções biológicas desde o crescimento, o desenvolvimento e a defesa da planta em situações de stress. Estes são responsáveis pela pigmentação, pela atividade antifúngica e antimicrobiana, pela proteção ultravioleta, pela quelação de metais pesados e pela atividade antioxidante dos frutos. (21, 22) O amargor e adstringência são as propriedades organoléticas mais associadas aos compostos fenólicos. (22, 23) Os compostos fenólicos na forma insolúvel estão normalmente ligados covalentemente a componentes da parede celular como a celulose, hemicelulose, lenhina e pectina. Estes fitoquímicos têm funções importantes na parede celular servindo de barreira física e química protegendo contra agentes patogénicos. (24)

Os compostos fenólicos existentes em diversos frutos como a maçã, a pera e a uva podem ser divididos em dois grupos, os ácidos fenólicos e os flavonóides. (22, 23) Os primeiros incluem os ácidos cinâmicos ( $C_3-C_6$ ) e os ácidos benzóicos ( $C_7$ ). Nas maçãs o ácido cinâmico maioritário é o ácido clorogénico e o minoritário o ácido cumárico. (25) Alguns frutos vermelhos, como o morango, são fontes de compostos fenólicos como o ácido gálico e elágico, compostos estes com atividade anticancerígena. (22) Os flavonóides têm em comum uma estrutura básica  $C_6-C_3-C_6$ , em que as diferentes classes de flavonóides diferem no número de grupos hidroxilo (-OH), no grau de insaturação e de oxidação do carbono 3. As catequinas, os flavonóis e as antocianinas são os flavonóides mais abundantes na maçã, pera e uva.

Aos compostos fenólicos também estão associados a efeitos indesejáveis como o acastanhamento dos frutos processados. O teor de antocianinas tem uma função crítica na qualidade da cor da maioria dos frutos frescos e processados. Durante o processamento e armazenamento a degradação e polimerização das antocianinas normalmente leva à perda de cor. A estabilidade da cor e o teor de compostos bioativos nos frutos vermelhos é influenciada por diversos fatores: pH, temperatura, tempo de processamento, oxigénio, atividade da água e condições de armazenamento. A perda de antocianinas deve-se principalmente à formação de complexos com outros compostos durante o processamento. A natureza da formação desses compostos não é conhecida mas pensa-se que estão envolvidos os açúcares e o ácido ascórbico (ou os seus compostos de degradação térmica), iões metálicos e peróxido de hidrogénio derivados de ácido ascórbico. (26, 27)

### **1.3.3 Vitaminas, Carotenóides e Minerais**

Os frutos frescos são os que mais contribuem para as necessidades vitamínicas diárias. Algumas vitaminas podem ser perdidas durante a lavagem, no caso das hidrossolúveis, e num armazenamento impróprio. Os fatores ambientais como a luz e a temperatura também afetam o teor vitamínico dos frutos. As vitaminas são necessárias em reações metabólicas e em concentrações inapropriadas podem levar a irregularidades no metabolismo celular. (24) De acordo com a solubilidade, as vitaminas podem ser distinguidas como lipossolúveis (A, D, E e K) e hidrossolúveis (C e complexo B). O  $\beta$ -caroteno, precursor da vitamina A, é a fonte primária deste micronutriente nos frutos. O  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina têm também notável atividade de provitamina A. Os frutos têm pouca quantidade de ácido fólico (B9) e a niacina (B3) pode estar ou não presente na forma disponível. A vitamina B6 é normalmente encontrada na forma de piridoxal ou piridoxamina. A maioria dos frutos, principalmente os citrinos, são ricos em vitamina C. (24, 28)

Os minerais são substâncias inorgânicas requeridas pelo organismo em baixas quantidades para manter os processos vitais no organismo. Os frutos têm elevado teor de magnésio, fósforo e potássio. Os frutos geralmente têm baixo teor de sódio, não sendo considerados como fontes deste mineral, embora alguns frutos como o kiwi e a tangerina possam ter uma quantidade apreciável. (29) O elevado teor de potássio está associado ao aumento da acidez e da coloração, enquanto elevadas quantidades de cálcio evitam o aparecimento de anomalias fisiológicas e melhoram a qualidade do fruto. (20)

### **1.3.4 Compostos voláteis**

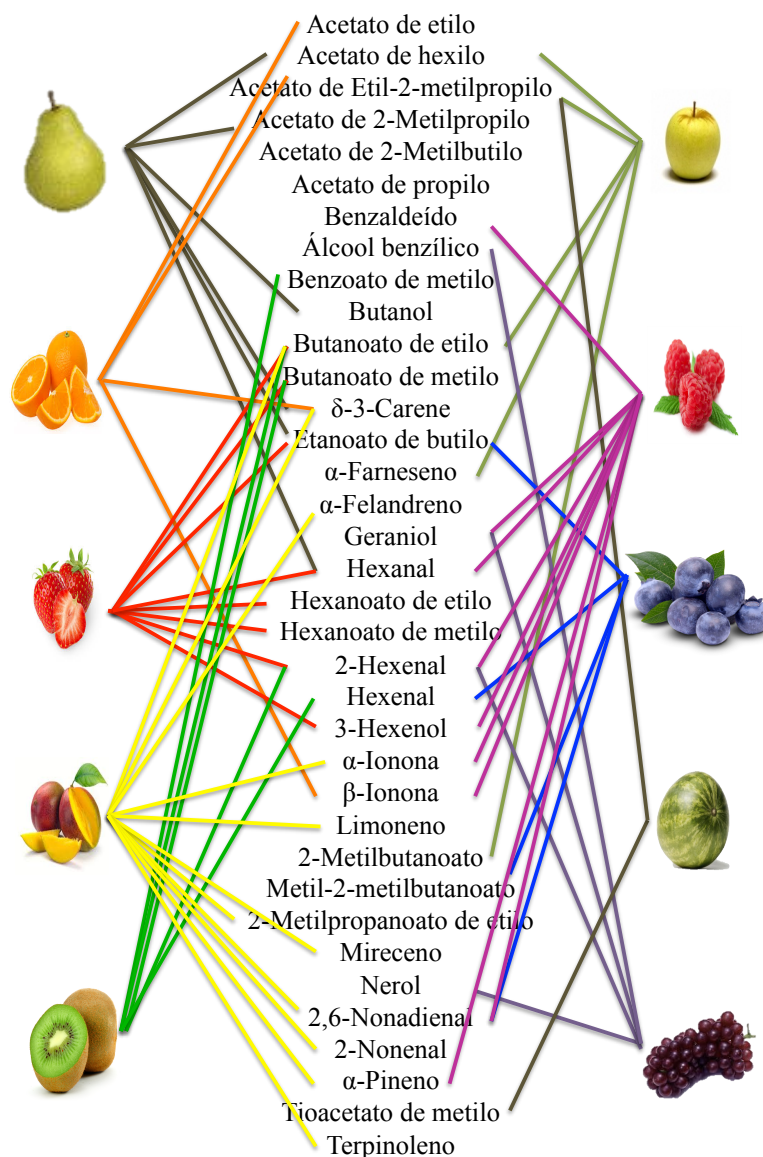
Os frutos produzem uma vasta gama de compostos voláteis que compõem os seus aromas característicos e contribuem para o seu sabor. O sabor consiste tanto na percepção sensorial na boca (doçura, acidez e amargor) como no odor, produzido por diversos compostos voláteis. O aroma é uma das características dos frutos mais apreciadas pelos consumidores. (30, 31) O perfil volátil dos frutos é complexo e varia consoante o cultivar, a maturação, as condições pré e pós-colheita, as condições do fruto (inteiro, cortado, homogeneizado). (31, 32)

Os compostos voláteis são maioritariamente compreendidos por ésteres, álcoois, aldeídos, cetonas, lactonas, terpenóides e apocarotenóides, estes últimos

resultantes da oxidação dos carotenóides por ação das dioxigenases. O grau de maturação, as condições ambientais, a colheita e o armazenamento são fatores que afetam a composição destes compostos. Existem várias vias de biossíntese de compostos voláteis. Os compostos aromáticos são os mais importantes, que derivam de várias fontes como os aminoácidos, os lípidos, os compostos fenólicos, os terpenóides e os carotenóides. As reações de modificação como a acetilação, a metilação, a ciclização e a oxidação/redução nos compostos formados pelas vias mencionadas anteriormente conferem diversidade aos compostos voláteis. (31) Embora diferentes frutos possam partilhar as mesmas características aromáticas, cada fruto tem um aroma distinto que depende da combinação, concentração e limiar de percepção individual dos compostos voláteis. (33) A maioria dos frutos produz um elevado número de compostos voláteis como indicadores de amadurecimento dos frutos. (34)

Os compostos voláteis podem ser classificados como metabolitos primários ou secundários indicando se foram produzidos no fruto intacto ou produzido como resultado da sua degradação. Os terpenóides são metabolitos secundários que variam de tamanho desde  $C_5$  (hemiterpenos) a  $C_{20}$  (diterpenos) e são constituídos por unidades repetidas de difosfato de isopentenilo (IPP). O IPP é biossintetizado pela via do mevalonato que se inicia com a condensação de Acetil-CoA. As reações de hidroxilação e desidrogenação dos precursores terpénicos resultam nos compostos responsáveis pelos diferentes aromas dos frutos. (35)

Os compostos aromáticos mais importantes nos frutos derivam principalmente dos ácidos gordos, de derivados lipídicos, fenólicos e terpenóides, como os mono- e sesquiterpenos. Estes dois últimos compõem o maior grupo de compostos presentes no perfil aromático. Na **Figura 1** está representada a composição volátil de alguns frutos. Assim é possível verificar que muitos dos compostos voláteis são comuns aos frutos, sendo outros marcadores específicos destes.



**Figura 1** – Compostos voláteis existem em diferentes frutos: pera, laranja, morango, manga, kiwi, maçã, framboesa, mirtilo, melão e uva. (36-45)

Os terpenóides, linalool, limoneno, valenceno e  $\alpha$ -pineno são compostos voláteis importantes para o aroma do morango e citrinos. (46, 47) Os terpenóides são compostos importantes para o sabor e aroma de muitos frutos. Existe um grupo de terpenóides geralmente presente em baixa concentração mas com grande influência na aceitação dos consumidores. Entre eles estão:  $\beta$ -ionona, geranilacetona, pseudoionona,  $\beta$ -ciclocitral e geranial. As suas características revelam uma origem isoprénica, tendo sido assumido que estes são produtos resultantes da oxidação dos carotenóides. (48)

## **1.4 Amadurecimento dos frutos**

O amadurecimento dos frutos é o resultado de alterações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem nestes de forma coordenada e sob influência genética. Este é o último estágio do desenvolvimento do fruto onde são desenvolvidas as características organoléticas desejadas como o sabor, a cor, a textura e o aroma. (6)

Os frutos podem ser classificados como climatéricos ou não climatéricos baseado na sua taxa de respiração. A maçã, a manga, a banana, a pera e o kiwi são exemplos de frutos climatéricos, enquanto os citrinos, os frutos vermelhos, o ananás e o melão fazem parte dos frutos não climatéricos. Os frutos denominados de climatéricos sofrem um aumento na taxa de respiração durante o amadurecimento que é acompanhada pelo aumento dos níveis de etileno, que tem um papel fundamental no amadurecimento. Esta hormona gasosa, de composição química  $C_2H_4$ , está envolvida no crescimento, desenvolvimento e tempo de vida de armazenamento de muitos frutos. O precursor do etileno é o aminoácido metionina que sofre conversão em S-adenosil-metionina (SAM) e posteriormente é convertido em 1-ácido-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela enzimas ACC sintase. Este composto, por sua vez, sofre ação da ACC oxidase convertendo o ACC em etileno. (15, 49) Desta forma a produção de etileno aquando do amadurecimento dos frutos é regulada pela atividade das enzimas ACC sintase e oxidase.

### **1.4.1 Ação enzimática**

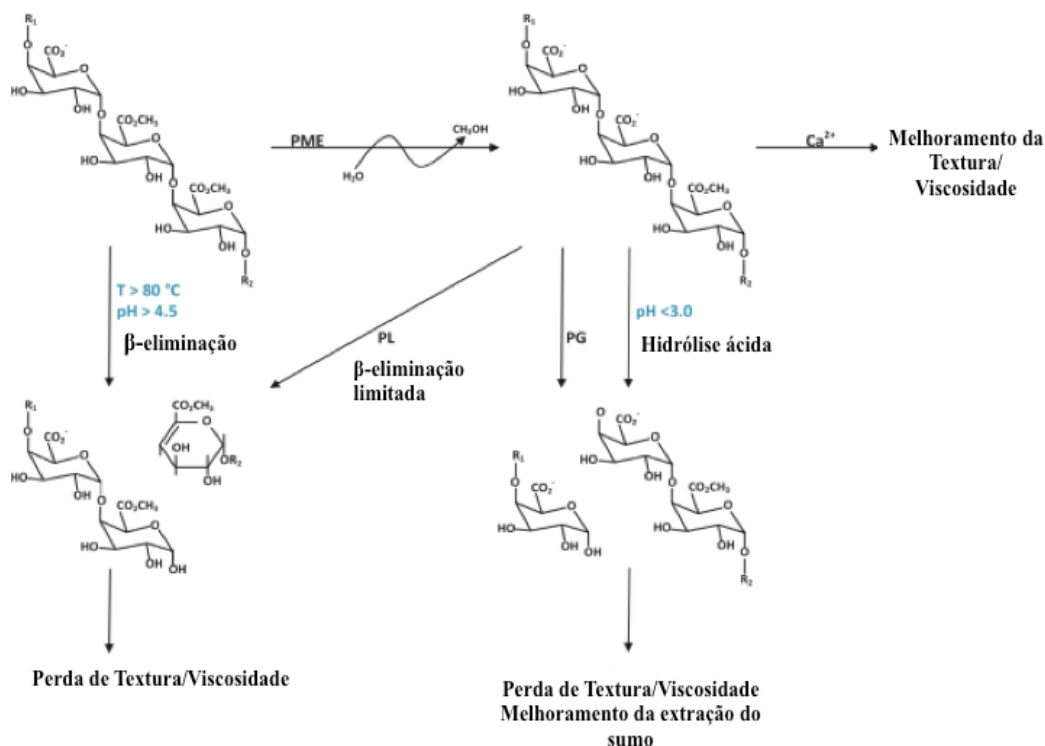
A alteração da textura dos frutos está normalmente associada à degradação da parede celular, devido à solubilização dos polissacarídeos que a constituem. Este processo é mediado por enzimas pectinolíticas e celulolíticas. A atividade das enzimas em geral aumenta com o amadurecimento dos frutos. (50)

O tempo de vida dos frutos processados é drasticamente influenciado por diversas reações tanto enzimáticas como também pela ação microbiana. As enzimas são biocatalizadores essenciais para a fisiologia e metabolismo das plantas que se mantêm ativas após a colheita. Estas reações enzimáticas ocorrem no amadurecimento promovendo alterações tanto a nível organolético (cor, sabor e textura), como a nível nutricional. (51)

### 1.4.1.1 Enzimas envolvidas na alteração da textura e consistência

A textura é uma das características valorizadas para a qualidade dos frutos. A parede celular primária, a lamela média, e o turgor gerado entre as células pela osmose são os principais responsáveis pela textura e integridade dos frutos.

A parede celular primária consiste numa matriz constituída por uma rede de celulose-hemicelulose entrelaçada com uma rede de polissacarídeos pécticos. A rigidez é conseguida pela coesão formada pela interação entre os diferentes tipos de polissacarídeos da matriz. A quebra destas ligações levará à perda de estabilidade da matriz, resultando na solubilização e/ou degradação da parede celular. A rigidez conferida pela celulose e hemicelulose não é significativamente afetada pelo processamento nem pelo armazenamento, enquanto os polissacarídeos pécticos são afetados tanto enzimaticamente como por reações não enzimáticas. As enzimas pectina metil-esterase (PME), a poligalacturonase (PG) e a pectina liase (PL) e a são as responsáveis pela degradação dos polissacarídeos pécticos e consequentes alterações na textura dos frutos (**Figura 2**). As reações não enzimáticas responsáveis pela despolimerização da pectina devem-se sobretudo ao processamento térmico a elevadas temperaturas ( $>80^{\circ}\text{C}$ ). (52, 53)



**Figura 2** - Representação esquemática das reações de conversão da pectina que alteram a textura e consistência dos frutos. PME – Pectina metil-esterase;  $\text{Ca}^{2+}$  - ligações cruzadas de cálcio; PG – Poligalacturonase; PL – Pectina Liase; T – Temperatura. (adaptado de Sila *et al* (51)).



#### 1.4.1.1.1 Polissacarídeos pécticos

Os polissacarídeos pécticos são considerados dos polímeros vegetais naturais mais complexos. A unidade básica é o ácido D-galacturónico (GalA). A homogalacturonana (HG) é um polissacarídeo linear constituído por unidades de GalA unidas por ligações  $\alpha$ -1-4 com alguns grupos carboxílicos metil-esterificados ou acetilados. A cadeia poligalacturónica é interrompida por um domínio péctico denominado de ramnogalacturonana I (RGI) que é enriquecida em ramnose (Rha). (51) A cadeia RGI consiste em repetições de dissacarídeos  $\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -D-GalA-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-Rha(1 $\rightarrow$ . As RGI podem conter galactanas, arabinanas e/ou arabinogalactanas ligadas aos resíduos de ramnose em  $\alpha$ -1-4, formando regiões muito ramificadas. (51)

A alteração da textura envolve a ação coordenada de inúmeras enzimas que atuam em diferentes polissacarídeos da parede celular sendo que as pectinases são as responsáveis pela degradação dos polímeros pécticos. A solubilização da pectina pode ser iniciada de diferentes formas: a) perda de cálcio, usado para estabilizar a estrutura gelificada da pectina; b) quebra das ligações entre a pectina e a hemicelulose; c) desemaranhamento dos complexos de pectina devido à hidrólise das cadeias de pectina; e d) despolimerização da pectina. (50) As hidrolases (PG) clivam ligações glicosídicas assistida por catálise ácido/base, enquanto que as liases (PL) fragmentam os polímeros via  $\beta$ -eliminação resultando na insaturação entre o C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub> num terminal não redutor. As pectinas liases podem ser endo- ou exo-enzimas e atuam preferencialmente nas cadeias pécticas muito substituídas por grupos metoxílicos, contrariamente à enzima pectato liase. (52)

A pectina metilesterase (PME) está envolvida no amadurecimento dos frutos sendo responsável pela desesterificação das pectinas (**Figura 2**). (52) A existência de pectinas desesterificadas devido à ação da PME resulta na ativação de outras enzimas como a poligalacturonase (PG) que vai clivar as ligações glicosídicas entre resíduos de ácido galacturónico (GalA) desesterificado contribuindo para as alterações da textura dos frutos. (54) A atividade da PME afeta a rigidez dos frutos em dois aspectos: 1) A PME retira os grupos metoxílicos das pectinas, facilitando a formação da estrutura em “caixa de ovos” entre cadeias poliméricas de GalA na presença de iões divalentes, como o cálcio, aumentando a rigidez do fruto; 2) a desesterificação das pectinas torna-as resistentes à degradação por  $\beta$ -eliminação (ação não enzimática). A despolimerização da pectina, por quebra das ligações  $\alpha$ -1-4 entre dois resíduos de

GalA, é a principal causa da ação da PG. A ação sinérgica da PME e PG resultam nas modificações da pectina que contribuem para a perda da qualidade da textura dos frutos. (52, 55)

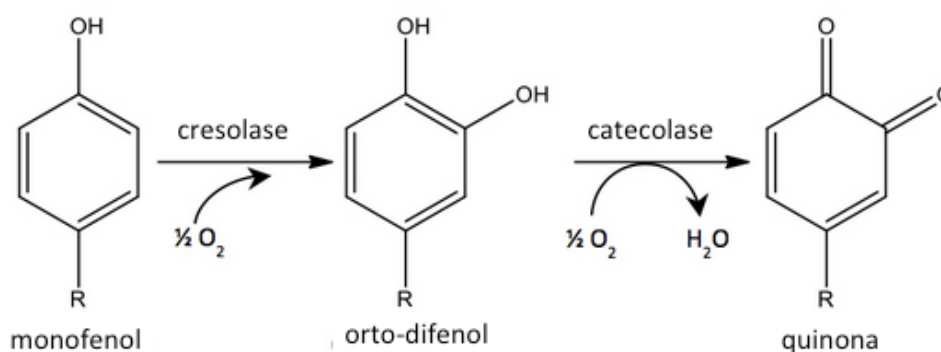
#### 1.4.1.2 Enzimas envolvidas na alteração da cor

A cor é um dos parâmetros visuais de maior relevância nos produtos alimentares, devido à sua importância para o consumidor. Para além da aceitação visual, a cor pode também dar informação acerca do estágio de maturação, do processamento do produto, entre outros. A prevenção do acastanhamento enzimático durante o processamento e o armazenamento dos frutos é a principal preocupação na indústria alimentar pois este acastanhamento dos frutos provoca uma reação negativa por parte dos consumidores. (52)

Os carotenos e carotenóides, as antocianinas, a clorofila e os compostos fenólicos são os pigmentos responsáveis pela cor dos frutos. As enzimas envolvidas na degradação bioquímica dos pigmentos vegetais são a polifenol oxidase (PPO), a peroxidase (POD), a  $\beta$ -glucosidase (antocianina- $\beta$ -glucosidase) e a clorofilase. (52) A atividade das enzimas mencionadas acima depende do produto.

##### 1.4.1.2.1 Polifenol oxidase

A polifenol oxidase (PPO) é uma enzima dependente de cobre que, na presença de oxigénio, reage com fenóis. Existem duas reações catalisadas pela PPO: hidroxilação de monofenóis a *o*-difenois (monofenolase ou cresolase) e oxidação de *o*-difenois a *o*-quinonas (difenolase e catecolase) como se encontra ilustrado na **Figura 3**. (56)



**Figura 3-** Reações de hidroxilação e oxidação catalisadas pela enzima polifenol oxidase.

As *o*-quinonas formadas são instáveis reagindo com polímeros de elevado peso molecular ou com complexos macromoleculares contendo aminoácidos e proteínas. A polimerização não enzimática destes compostos intermediários e a condensação de *o*-quinonas resultam em pigmentos pretos, castanhos e vermelhos. (56) Os açúcares existentes na estrutura das antocianinas impedem a ação da PPO. A remoção destes, pela ação de uma  $\beta$ -glucosidase (antocianase) resulta na formação de antocianidinas, que, desta forma, podem ser oxidadas pela PPO. Embora a PPO não tenha efeito direto nas antocianinas, estas podem também reagir com produtos resultantes da ação oxidativa da PPO – *o*-quinonas – originando produtos castanhos. (52) A enzima PPO tem um forte impacto nas propriedades organoléticas relativas ao sabor e aroma, a diminuição da adstringência em uvas por reagirem com os taninos responsáveis por essas propriedades. (56) A PPO também está envolvida na degradação oxidativa do ácido ascórbico.

De forma a prevenir o acastanhamento dos frutos, a inibição ou inativação da enzima PPO pode ser feita por remoção de um dos substratos ( $O_2$ ,  $Cu^{2+}$  ou fenóis) ou impedir que os produtos intermediários formem melanoidinas. (57) Vários métodos são usados para evitar o acastanhamento dos frutos, tais como tratamento térmico, refrigeração, diminuição do pH e inibidores enzimáticos. (52)

#### *1.4.1.2.2 Peroxidase*

A peroxidase (POD) é encontrada na maioria dos organismos vivos e a sua principal função fisiológica é controlar os níveis de peróxido gerado nas reações de oxigenação para contrabalançar a formação de espécies reativas de oxigénio no organismo. A peroxidase está envolvida na degradação da cor e sabor dos frutos. Esta catalisa a oxidação dos compostos fenólicos na presença de peróxido de hidrogénio levando à formação de produtos acastanhados. (52) Está descrito que a PPO pode ter efeito promotor da POD uma vez que o peróxido de hidrogénio é gerado durante a oxidação dos compostos fenólicos catalisados pela PPO. (56)

A POD catalisa a formação de ligações cruzadas entre compostos fenólicos e os polímeros das paredes celulares melhorando a textura de alguns frutos durante o processamento térmico. Isto deve-se à atividade das peroxidases ligadas à parede celular que na presença de peróxido oxidam os compostos fenólicos como o ácido ferúlico que se encontra na parede celular. Isto leva à formação de ligações cruzadas

de ácidos ferúlicos entre polissacarídeos da parede celular promovendo a adesão celular. A POD é relativamente estável a elevadas temperaturas (até aproximadamente 70 °C), por essa razão assume-se que se a POD está inativa as restantes enzimas também estão inativas. (52, 58)

#### *1.4.1.2.3 $\beta$ -glucosidase*

A  $\beta$ -glucosidade é responsável pela quebra de ligações  $\beta$ -1-4 entre moléculas de glucose, libertando D-glucose. Esta enzima é específica para substratos D- $\beta$ -glucósidos e é sintetizada pela planta em situações de stress. (59)

A enzima antocianase (antocianinas- $\beta$ -glucosidase) é uma  $\beta$ -glucosidase específica que catalisa a hidrólise de açúcares das antocianinas formando antocianidinas instáveis que são, posteriormente, oxidadas por ação da PPO e POD, como referido anteriormente. Desta forma a antocianase deve ser controlada durante o armazenamento e processamento de frutos ricos em antocianinas como os frutos vermelhos. (52)

#### **1.4.1.3 Enzimas envolvidas na alteração do sabor - “off flavor”**

O sabor, igualmente como a cor, é uma qualidade muito importante para conquistar o consumidor. Existem enzimas que causam sabor desagradável nos frutos, especialmente durante o seu armazenamento, nomeadamente a lipoxigenase (LOX) e a hidroperóxido liase (HPL). (52)

##### *1.4.1.3.1 Lipoxigenase*

A ação da lipoxigenase origina a oxidação dos ácidos gordos polinsaturados e ésteres em hidroperóxidos. O papel fisiológico da LOX ainda não está bem estabelecido, tendo esta enzima sido associada a processos de crescimento e desenvolvimento do fruto. A formação de compostos voláteis nos frutos é também resultado da atividade da LOX. (52)

A oxidação dos ácidos gordos polinsaturados envolve a formação de radicais livres, um efeito prejudicial à qualidade do produto devido: a) à perda nutricional por destruição dos ácidos gordos essenciais, linoleico (18:2), linolénico (18:3) e araquidónico (20:4) e indiretamente na degradação de vitaminas e proteínas por ação dos hidroperóxidos e radicais livres intermediários; b) ao desenvolvimento de sabores

desagradáveis “*off-flavors*” devido à degradação dos hidroperóxidos em compostos voláteis como aldeídos, cetonas e álcoois; e c) à perda de cor devido à degradação da clorofila e carotenos. (52)

#### *1.4.1.3.2 Hidroperóxido Liase*

A hidroperóxido liase é a enzima chave para a síntese de compostos voláteis que contribuem para o sabor “fresco” dos frutos maduros. Esta enzima cliva os hidroperóxidos resultantes da ação da LOX em aldeídos C<sub>6</sub>, como por exemplo o hexanal, que conferem ao fruto o seu aroma e sabor “fresco”. Estes aldeídos podem ser ainda convertidos nos seus respetivos álcoois por ação da enzima álcool desidrogenase. (52)

Estes compostos responsáveis pelo sabor são essenciais, contudo a sua concentração acima dos níveis normais vai despoletar o desenvolvimento do “*off-flavor*”. Neste caso a inativação térmica pode ser um obstáculo uma vez que a HPL tem várias isoformas com diferentes termo-estabilidades. (52, 60)

### **1.5 Efeito do processamento na qualidade do produto**

As operações mínimas de processamento danificam a integridade do tecido de certos produtos, resultando na descompartimentalização de enzimas e substratos, levando à deterioração bioquímica dos frutos, como o acastanhamento, aparecimento do sabor desagradável e perda da textura original. Para além disso, a rutura do tecido induz o aumento da taxa de respiração, o que desencadeia processos de senescência, tal como o aumento dos níveis basais de etileno e a alteração da razão O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, que vão induzir o amadurecimento do fruto. (15, 61)

O uso de atmosferas controladas de oxigénio, a adição de químicos e a refrigeração podem ser métodos usados para prolongar o tempo de vida dos frutos. Contudo, estes métodos de preservação não são tão eficientes como o tratamento térmico relativamente à segurança microbiana. O ideal para manter a qualidade e segurança do produto seria a combinação dos vários métodos de preservação. (61) As alterações de textura, sabor e aparência são os fatores limitantes na qualidade dos frutos processados. (62)

### 1.5.1 Processamento térmico

A pasteurização é o processo térmico convencional aplicado no processamento de frutos. Existem vários métodos de pasteurização, em que se faz variar a razão temperatura/tempo a que o produto é sujeito. De entre os diferentes métodos de pasteurização distinguem-se o **LTLT** (*Low Temperature-Long Time*) e **HTST** (*High Temperature-Short Time*). O primeiro baseia-se no aquecimento do alimento a temperatura mais baixa ( $< 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por um longo período de tempo, enquanto o segundo consiste no aquecimento do alimento a temperaturas mais elevadas por um curto espaço de tempo. (63) Todos os alimentos, independente de sua origem, podem apresentar uma natureza microbiana variável, concentrada principalmente na região superficial. Contudo, os tecidos internos podem também apresentar microrganismos viáveis. As frutas contêm atividade de água ( $A_w$ ) superior a 0,98 pelo que são muito suscetíveis à deterioração por bactérias, bolores ou leveduras. Os produtos frutíferos processados com  $\text{pH} < 4$  dificultam o desenvolvimento de patogénicos. Apenas os microrganismos acídicos – bolores, leveduras e algumas bactérias – conseguem desenvolver-se nessas condições. (64)

O tratamento térmico inativa as enzimas responsáveis pelas alterações de textura, prolongando o tempo de vida do produto. A aplicação de tratamentos térmicos a baixas temperaturas ( $50\text{-}80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) reduz a atividade da PME retardando o amolecimento dos frutos. (51, 52) A PME e a PG são relativamente estáveis a temperaturas elevadas. O tratamento dos frutos a temperaturas inferiores a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  resulta apenas na inativação parcial destas originando produtos com baixa consistência e sinérese durante o armazenamento. Já o tratamento com uma temperatura superior origina perdas de qualidade a nível da cor e sabor dos frutos devido a reações não enzimáticas. (52)

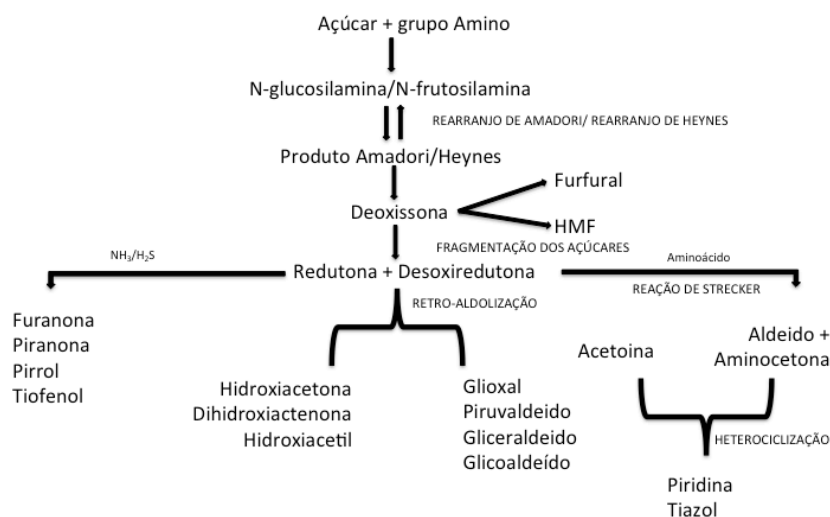
No processamento dos frutos, devido ao uso de temperaturas mais elevadas, pode ocorrer a formação de polímeros acastanhados, denominados de melanoidinas. As melanoidinas são sensíveis a alterações físicas e estruturais do alimento ( $\text{pH}$ , temperatura, tempo, concentração de açúcares, atividade da água). Este acastanhamento pode resultar de reações não enzimáticas. Ultimamente estes polímeros acastanhados têm ganho relevante importância devido à sua influência a nível sensorial, nutricional, toxicológico e tecnológico. (18)

### 1.5.1.1 Acastanhamento não enzimático

As reações de acastanhamento são importantes durante o processamento e armazenamento devido à influência na estabilidade e qualidade dos alimentos. Nos frutos este acastanhamento pode ocorrer devido essencialmente à reação de Maillard e à degradação do ácido ascórbico. (65)

#### 1.5.1.1.1 Reações de Maillard

A reação de Maillard é iniciada por condensação entre um grupo carbonilo de uma aldose ou cetose e um grupo amino de um aminoácido resultando numa N-aldoseamina ou N-cetosamina. Este produto condensado sofre perda de água convertendo-se numa base de Schiff. A ciclização da base de Schiff para a correspondente glicosamina, seguida do rearranjo de Amadori resulta no produto de Amadori ou Heynes, caso seja aldose ou cetose, respetivamente. O rearranjo de Amadori é considerado o passo-chave para a formação dos intermediários responsáveis pelo acastanhamento. O segundo estágio da reação de Maillard é a degradação do produto de Amadori, que consoante as condições de temperatura e pH, leva à formação de diferentes compostos intermédios como o furfural e o hidroximetilfurfural (HMF), as redutonas e os aldóis, que após condensação entre eles formam os co-polímeros nitrogenados denominados de melanoidinas como é possível ver na **Figura 4**. (18)



**Figura 4** - Representação esquemática das Reações de Maillard. (adaptado de Van Boekel *et al* (66)).

Nos frutos, as reações de Maillard não só afetam a qualidade sensorial dos produtos mas também as nutricionais devido à formação de compostos tóxicos como o furfural e o HMF. Estas reações não enzimáticas podem ser minimizadas controlando a temperatura e a atividade da água. (18)

#### *1.5.1.1.2 Degradação do ácido ascórbico*

O ácido ascórbico ou vitamina C faz parte dos compostos nutricionais naturais existentes em maior quantidade nos frutos. Em sistemas aquosos, o ácido ascórbico é muito instável e facilmente degradável tanto em condições aeróbias como anaeróbias. Os fatores que mais afetam a estabilidade do ácido ascórbico no processamento e armazenamento dos frutos incluem o oxigénio, a temperatura, o pH, a atividade da água, a luz e o teor de açúcares. (67)

Na presença de oxigénio, o ascorbato degrada-se em desidroascorbato (DHAA). Este composto não é estável e converte-se em ácido 2,3-L-dicetogulónico que é descarboxilado formando um composto intermediário que é posteriormente convertido em outros produtos de degradação do ascorbato. Estes podem interagir com compostos dos alimentos causando o acastanhamento, alterando o sabor e levando à perda de qualidade. (67) De entre esses compostos intermédios estão ácidos carboxílicos, cetonas e aldeídos. Como antioxidante, o ácido ascórbico atrasa o escurecimento, porém após um período de armazenamento este atua como pro-oxidante induzindo-o. (68) A oxidação de ácido ascórbico é não enzimática na natureza, contudo esta pode ser catalisada por enzimas como a ascorbato oxidase que catalisa a oxidação da vitamina C. (52)

Para além da degradação do ácido ascórbico, o processamento térmico resulta também na diminuição dos compostos fenólicos nos frutos que pode dever-se não só à oxidação dos compostos mas também à migração destes para o exterior, para os produtos de lixiviação, ou no caso das saladas de fruta para o sumo no qual os frutos estão embebidos. As antocianinas são um exemplo de composto fenólico que é transferido para a solução exterior aquando do processamento térmico nos frutos vermelhos. (69) As antocianinas são compostos lábeis e a sua estabilidade é altamente variável com a estrutura e a composição da matriz em que se encontram. A perda de antocianinas e/ou formação de compostos acastanhados durante o processamento e armazenamento dos frutos tem sido atribuída a diferentes fatores como o pH, acidez,



compostos fenólicos, açúcares e produtos de degradação de açúcares, oxigénio, ácido ascórbico, maturação do fruto e tempo de descongelamento. (27) Enquanto o tratamento térmico inicial pode levar à perda de nutrientes, estes são relativamente estáveis durante o armazenamento devido à falta de oxigénio. O efeito do processamento e armazenamento varia consoante o produto. O tratamento térmico diminui o teor de nutrientes hidrossolúveis e não estáveis termicamente, como a vitamina C e B. (29, 69) a perda de vitamina C, compostos fenólicos totais e antocianinas leva à diminuição da atividade antioxidante como resposta ao tratamento térmico dos frutos. O aumento progressivo da cor e a correspondente perda de antocianinas monoméricas durante o armazenamento devem-se maioritariamente à extensa polimerização entre antocianinas em analogia ao sucedido em vinhos e sumos. (70, 71)

### **1.5.2 Processamento não térmico**

No processamento não térmico incluem-se as técnicas de preservação dos alimentos que não envolvem aplicação de calor. A adição de conservantes, o uso de atmosferas controladas e a refrigeração são algumas das técnicas convencionais mais utilizadas para manter a estabilidade microbiana e preservar o alimento. A elevada perecibilidade dos frutos requer um controlo mais apertado do processamento. A lavagem, o corte e o descasque são pontos essenciais de controlo pois o contacto direto entre os frutos cortados e os respetivos compostos libertados devido ao corte dos tecidos do próprio fruto e em contacto com a atmosfera envolvente, torna-os suscetíveis a reações de oxidação, como é o caso dos compostos fenólicos que se encontram em quantidades significativas na camada exterior dos frutos sendo perdidos durante o descascamento. Esta remoção resulta na perda de 13-48% de fenóis totais, dependendo do estágio de maturação do fruto. (69) A perda de qualidade dos frutos pode ser evitada usando técnicas de conservação químicas e físicas. (72)

Os conservantes químicos mais utilizados nos frutos são o ácido benzóico e seus derivados: ácido salicílico, ácido fórmico, formaldeído, SO<sub>2</sub>, entre outros. A decorrente associação destes químicos a um possível perigo alimentar despoletou a procura de produtos naturais alternativos. O jasmonato de metilo, os óleos essenciais e o etanol são compostos naturais aplicados como conservantes de frutos. (72)

Diversos tratamentos de pós-colheita tem sido desenvolvidos para conservar a frescura e evitar o crescimento microbiano, como por exemplo, uso de atmosferas controladas e modificadas. (72) Durante o armazenamento, a nível da embalagem é possível manipular a composição gasosa a que o alimento é sujeito. O controlo dos constituintes gasosos na atmosfera controlada é mais preciso e estável do que na atmosfera modificada, onde a composição gasosa não é controlada ao longo do tempo. O efeito da aplicação destas atmosferas no frutos depende de vários fatores: do cultivar dos frutos, da concentração de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, de outros gases existentes e da temperatura e duração do armazenamento. A pressão de O<sub>2</sub> influencia a composição dos frutos pois uma atmosfera com elevada pressão de O<sub>2</sub> resulta num aumento de compostos fenólicos, e um nível baixo de O<sub>2</sub> impede a degradação de ácido ascórbico e carotenos durante o armazenamento. (73) O uso de uma atmosfera com 1% de O<sub>2</sub> pode levar a uma redução de 50% na produção de etileno, porque o oxigénio é substrato para reação catalisada pela enzima ACC oxidase. (15) O uso de atmosferas controladas com baixa concentração de O<sub>2</sub> impede por exemplo, a oxidação dos compostos fenólicos e a atividade de algumas enzimas, por exemplo, a PPO. (56, 62)

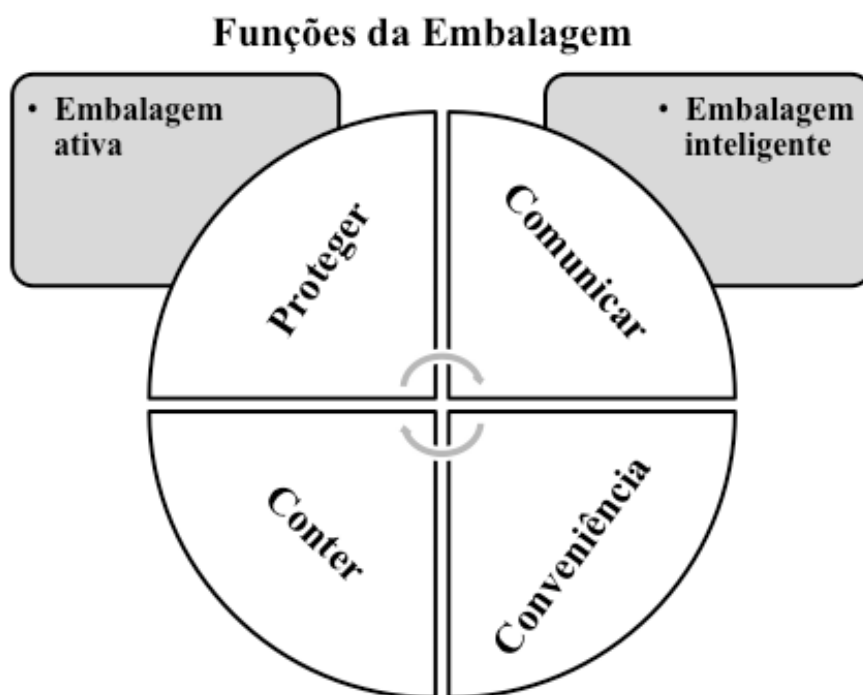
A síntese das enzimas responsáveis pela degradação da parede celular dos frutos – como a poligalacturonase – estão diretamente relacionadas com os níveis de oxigénio presentes no fruto. A pouca disponibilidade de oxigénio inativa estas enzimas e o pré-tratamento dos frutos em condições anaeróbicas diminui a atividade dessas enzimas promovendo a qualidade dos frutos, já que estas estão envolvidas no amolecimento e amadurecimento destes. (15)

A refrigeração é um procedimento necessário para desacelerar as reações de deterioração que ocorrem nos frutos de forma a manter a qualidade destes após a colheita, pois diminui a respiração dos frutos e permite um maior tempo de vida. Com o processamento dos frutos a respiração é interrompida, parando assim o consumo de nutrientes por parte do fruto. A temperatura de armazenamento, juntamente com a luz e a exposição ao oxigénio são fatores-chave de controlo por estes influenciarem a estabilidade dos compostos existentes nos frutos, como por exemplo os compostos antioxidantes. O tempo de vida dos frutos é controlado principalmente com o uso da refrigeração, contudo esta técnica pode influenciar a qualidade nutricional do fruto. Alguns frutos devem ser armazenados a temperaturas mais baixas ( $T < 10^{\circ}\text{C}$ ) para garantir a qualidade sensorial e aumentar o tempo de vida, mas o armazenamento a

temperaturas superiores resulta no aumento significativo da qualidade nutricional dos frutos. (73)

## 1.6 Embalagem

A exigência por parte da indústria alimentar em garantir produtos alimentares bem preservados, frescos, saborosos e com garantia de qualidade e tempo de vida prolongado tem proporcionado a inovação tecnológica no embalamento dos alimentos. No embalamento tradicional dos alimentos, a embalagem é usada apenas para suporte mecânico do produto e proteção contra agentes externos - microrganismos, oxigénio, luz, entre outros. As embalagens devem ser o mais inertes possível não permitindo a interação entre o alimento e a embalagem. As embalagens convencionais exercem quatro funções básicas: conter, proteger, comunicar e conferir conveniência (Figura 5). (74, 75)



**Figura 5** - Funções básicas das embalagens convencionais e a atuação das novas embalagens: ativas e inteligentes (adaptado de Yam *et al* (76)).

O conter consiste em assegurar que o produto não foi derramado ou disperso intencionalmente. A embalagem protege o alimento de fatores ambientais como o calor, luz, presença ou ausência de humidade, oxigénio, pressão, enzimas, microrganismos, insetos, sujidade, gases, entre outros. A comunicação serve como

ligação entre o consumidor e o alimento, este contém informação sobre o peso, fonte, ingredientes, valor nutricional e precauções a tomar. A promoção ou marketing pelas empresas é conseguida pelas embalagens no momento da compra do alimento. (76)

### **1.6.1 Embalagens ativas**

As embalagens ativas permitem a interação da embalagem com o alimento e/ou a atmosfera envolvente ajudando na conservação deste permitindo o maior tempo de vida possível e garantindo a qualidade, a segurança e as características sensoriais do produto.

O princípio das embalagens ativas baseia-se tanto nas propriedades intrínsecas dos polímeros existentes no material da própria embalagem como na introdução de outros agentes ativos que desempenhem também essa função. Os agentes ativos podem ser incorporados dentro do material da embalagem ou à superfície. Estes agentes podem ser enzimas, ácidos orgânicos, fungicidas, extratos naturais, ou mesmo compostos ou materiais inorgânicos. Assim, estas embalagens podem permitir o controlo do alimento a vários níveis: controlando a oxidação e as taxas de respiração do alimento; e controlando também o crescimento microbiano e migração da humidade. (75) A introdução da nanotecnologia em embalagens alimentares é atualmente de grande interesse uma vez que as nanoestruturas têm uma elevada relação superfície:volume, possuindo propriedades específicas associadas ao tamanho nanométrico, bastando adicionar uma pequena quantidade de nanoestruturas ao material de embalagem para se obterem nanocompositos com propriedades extraordinárias. (77)

Exemplos de forma de interação com o alimento são a libertação/absorção de substâncias para o/do alimento ou ambiente envolvente, como a libertação de CO<sub>2</sub> ou etileno e a absorção de água libertada pelo alimento, a atividade antimicrobiana e antioxidante. (74, 75)

A permeabilidade seletiva dos compostos gasosos existentes no interior da embalagem pode ser também conseguida com o uso de agentes ativos. Diversos nanocompósitos podem ser usados como agentes ativos para evitar que o O<sub>2</sub>, o CO<sub>2</sub> e a humidade alcancem o alimento. A presença de O<sub>2</sub> na embalagem pode acelerar reações oxidativas que resultam na deterioração do alimento, pelo que a aplicação de um agente absorvente de O<sub>2</sub> diminui a sua concentração na embalagem. O óxido ferroso é o absorvente mais comumente usado. Outros agentes podem ser o ácido

ascórbico, sulfitos, catecol e enzimas como a glucose oxidase. Estes absorvedores têm sido usados atualmente na indústria alimentar, no sector cárneo. (74)

O CO<sub>2</sub> é um gás adicionado em alimentos como a carne e produtos cozinhados. Este também reduz a taxa de respiração de produtos frescos e é administrado na forma de bicarbonato, contudo um elevado teor de CO<sub>2</sub> no alimento, resultante das reações oxidativas e deterioração do alimento, pode levar à perda de qualidade do produto. (75)

Embalagens com propriedades antimicrobianas são usadas para garantir a segurança e qualidade do produto ao reduzirem a contaminação superficial dos produtos processados. Os agentes antimicrobianos inativam o crescimento microbiano forçando-os a permanecerem na fase *lag* do crescimento evitando a proliferação dos microrganismos (tanto os responsáveis pela deterioração como os patogénicos). Estes agentes podem ser incorporados diretamente no material da embalagem ou usados na forma de vapor. Os sais de prata, álcool etílico, ácidos orgânicos (ácido acético, benzoico, láctico e tartárico), isotiocianato de alilo e óxidos metálicos são agentes antimicrobianos. Os óxidos de magnésio e zinco também têm sido explorados como antimicrobianos para embalagens alimentares. (74)

### **1.6.2 Embalagens inteligentes**

As embalagens inteligentes permitem a monitorização da qualidade do produto, evidenciam os pontos críticos de controlo e dão uma informação mais detalhada do seu estado. Os indicadores visuais mais utilizados são os indicadores de temperatura crítica e indicadores de tempo/temperatura, com base na taxa de polimerização, em reações químicas e enzimáticas. (75) Os indicadores podem informar acerca de alterações ocorridas no produto ou na atmosfera envolvente, como o pH e a temperatura, por alterações visuais. Para além da informação acerca da origem, composição e validade do alimento, esta embalagem fornece também o histórico do produto – condições de armazenamento, crescimento microbiano, etc. (74) Os indicadores de humidade e oxigénio foram os primeiros sensores a serem aplicados nas embalagens para garantir a qualidade dos alimentos. Para além destes já foram desenvolvidos diversos sensores como: indicadores de etanol para produtos cozinhados, indicadores de etileno para frutos climatéricos, indicadores de dióxido de carbono, indicadores de tempo/temperatura (ITTs) e indicadores de radiofrequência

(RFID). (75) Estes dispositivos podem ser incorporados no material da embalagem ou ligados ao interior ou exterior da embalagem.

A identificação por radiofrequência (RFID) é um sistema *wireless* que usa ondas rádio para monitorizar os alimentos. Este sistema utiliza etiquetas, leitores e um sistema computacional. Os princípios do sistema RFID consiste na ativação da informação existente nas etiquetas por um leitor que a descodifica e transfere para o sistema computacional para posterior processamento. Este sistema tem sido aplicado recentemente na indústria alimentar, desde a monitorização dos alimentos à rastreabilidade destes promovendo a segurança alimentar e melhorando a cadeia de transporte de alimentos. O elevado custo das etiquetas e a necessidade de sistemas de leitura e descodificação de dados em muitos pontos têm sido a principal limitação para o uso de sistemas RFID. (74)

#### ***1.6.2.1 Aplicação de sensores para controlo da temperatura de pasteurização***

A temperatura é um dos fatores ambientais mais determinantes na conservação dos alimentos, pelo que variações de temperatura durante a confeção e/ou armazenamento do produto podem comprometer a segurança alimentar e o tempo de vida deste.

##### ***1.6.2.1.1 Sensores termocromáticos***

Os sensores cromáticos desempenham uma função importante em diferentes tipos de sensores. A principal vantagem de um sensor cromático é permitir a indicação visual da cor sem ser necessário converter em sinal digital, ou seja, recorrer a técnicas espectroscópicas ou espectrofotométricas. (78) Os materiais cromogénicos mais comuns são os fotocrómicos, termocrómicos e electrocrómicos onde o estímulo é a irradiação por luz (fótons), alteração da temperatura e aplicação de um campo eléctrico, respetivamente. O termocromismo, ou seja, a alteração visual da cor aquando da “temperatura de transição” é uma alteração colorimétrica dependente da temperatura e das propriedades óticas do cromóforo. Normalmente o termocromismo ocorre numa gama de temperatura onde é observada a gradual alteração da cor (termocromismo contínuo). O termocromismo descontínuo envolve a transição de fase a uma temperatura de transição específica. Esta transição pode ser reversível ou irreversível. Assim, os compostos termocromáticos podem ser aplicados

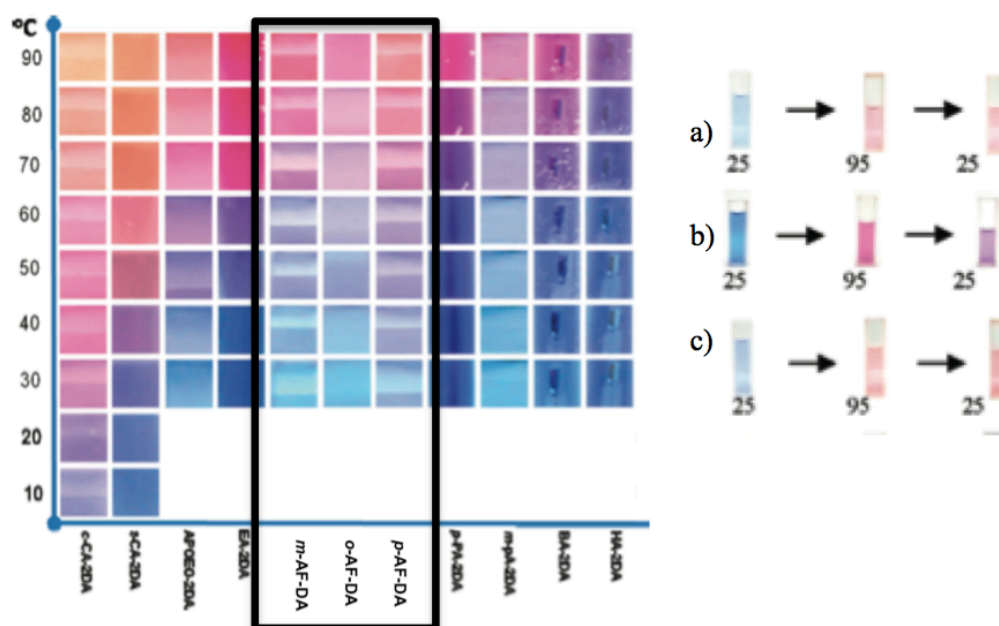
tecnologicamente como termômetros ou sensores de temperatura. (79) Os indicadores de temperatura em embalagens existem em pequena quantidade no mercado por questões econômicas e devido à falta de materiais biologicamente seguros para serem utilizados em alimentos. (80)

Nos últimos anos tem havido um aumento no interesse na produção de nanopartículas de óxidos de vanádio de forma a incorporar propriedades termocromáticas em alguns materiais, como janelas inteligentes, sensores de temperatura e bolômetros. (81) Os óxidos de vanádio ( $\text{VO}_x$ ) são óxidos complexos devido aos diferentes estados de valência do vanádio. O valor de 'x' nos diferentes óxidos de vanádio varia entre 1-2,5 e alguns dos óxidos de vanádio comuns são  $\text{VO}$ ,  $\text{VO}_2$ ,  $\text{V}_2\text{O}_3$ ,  $\text{V}_4\text{O}_7$  e  $\text{V}_2\text{O}_5$ . (82)

O dióxido de vanádio é um composto termocromático que sofre uma transição cristalográfica de estrutura monoclinica a baixa temperatura para estrutura tetragonal à temperatura de  $\sim 68^\circ\text{C}$ , resultando em alterações drásticas nas propriedades óticas e elétricas. (79) Aquando da transição de fase, o material deixa de ser semicondutor e transparente passando a ser condutor – metálico - e refletindo na região infravermelha. De entre o vasto número de óxidos metálicos com fase de transição, o dióxido de vanádio ( $\text{VO}_2$ ) aparece como um dos materiais com maior importância devido as suas propriedades elétricas e óticas, sendo completamente reversível a  $68^\circ\text{C}$ . Existem cinco polimorfos de dióxido de vanádio sendo o polimorfo que contém a fase monoclinica/tetragonal (M/T) o que apresenta completa reversibilidade de cor. Várias técnicas como deposição por pulverização, deposição por laser pulsado (PLD) e deposição por vapor químico tem sido aplicadas para obter filmes de  $\text{VO}_2$  com a fase M/T. A temperatura de transição pode ser ajustada por conjugação da temperatura e da transmitância ao mesmo comprimento de onda. (81)

Os polidiacetilenos (PDAs) têm sido indicados como potenciais sensores cromáticos universais devido à fácil resposta a estímulos químicos, mecânicos e de temperatura. Estes derivam do ácido 10,12-pentacosadinóico (PCDA) e 10,12-docosadinedióico (DCDA). Os PDAs tem uma estrutura conjugada unidimensional com uma absorção forte na banda de transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  na região vermelha do espectro visível resultando na alteração de cor para azul.. Quando aquecido dá-se a transição termocromática de muitos PDAs de azul para vermelho (**Figura 6**). Esta transição

pode ser reversível ou irreversível após o arrefecimento, dependendo da estrutura e interação das cadeias laterais do PDA. (78)



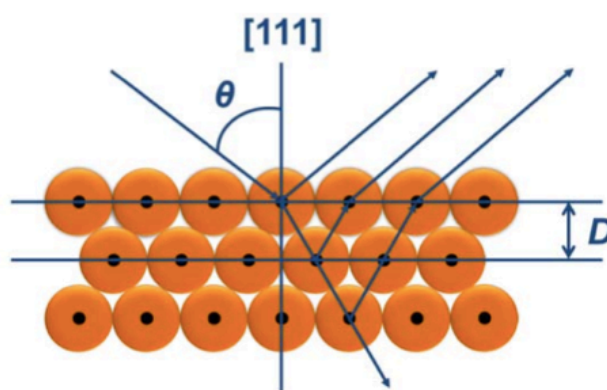
**Figura 6** –Transição da cor dos PDAs com a temperatura consoante o aquecimento a que são sujeitos- Reversibilidade termocromática de: a) o-AF-DA; b) m-AF-DA e c) p-AF-DA (adaptado de Wacharasindhu *et al* (80)).

A transição da cor com a temperatura e a reversibilidade termocrômica dos polímeros de PDA depende do número de grupos amida na estrutura. Os PDAs podem ser preparados por polimerização sólida de compostos diacetilénicos na correspondente forma cristalina ou polimerizados em conjuntos lipídicos. Estes últimos podem formar nano-vesículas permitindo que estes dispersem em soluções aquosas possibilitando a produção de soluções homogêneas de vesículas de PDA para uso como sensores biológicos. (80) Wacharasindhu *et al.* (61) sintetizaram diacetilenos contendo tanto um como dois grupos funcionais amida resultantes da condensação de PCDA com vários compostos diamina. Da síntese dos monómeros de PDA resultaram três compostos termocromáticos irreversíveis. Estes compostos apresentam uma variação de cor entre os 30 e os 90 °C. (80)

Sensores colorimétricos, que traduzem alterações ambientais em modificações visíveis da cor promovem uma forma simples e fácil de deteção que, ultimamente, tem sido usada para desenvolver sensores biológicos, químicos e físicos. (83, 84) Os cristais fotónicos (CF) têm recebido, ao longo dos anos, uma atenção considerável a



tanto a nível académico como industrial. (84, 85) Os materiais fotónicos existem largamente na natureza e são encontrados em espécies de pássaros, borboletas e insetos. Inspirados nestas demonstrações biológicas, os CF têm sido desenvolvidos como materiais cromotrópicos para uso como sensores colorimétricos por combinação de materiais responsáveis por promoção de estímulos externos com solventes, vapores, temperatura, força iónica e pH. O aparecimento da cor nos CF deve-se a fenómenos de interferência e reflexão que podem ser descritos pela *Lei de Bragg e Snell* (84, 86, 87) demonstrada na **Figura 7**. A **Equação 1 (Eq 1)**, onde  $\lambda$  é o comprimento de onda da luz refletida,  $n_{eff}$  é a média do índice de refração do material que compõe o cristal fotónico,  $D$  é a distância de difração no plano e  $\theta$  é o ângulo de Bragg da luz incidente na nanoestrutura, permite descrever este fenómeno. Baseado na **Eq 1**, existem várias formas de controlar a cor, como: a) o espaço entre os planos ( $D$ ); b) o índice de refração; e c) o ângulo de Bragg. A dependência do  $\lambda$  nas características dos materiais fotónicos é a razão pela qual estes são usados no desenvolvimento de sensores. (84)



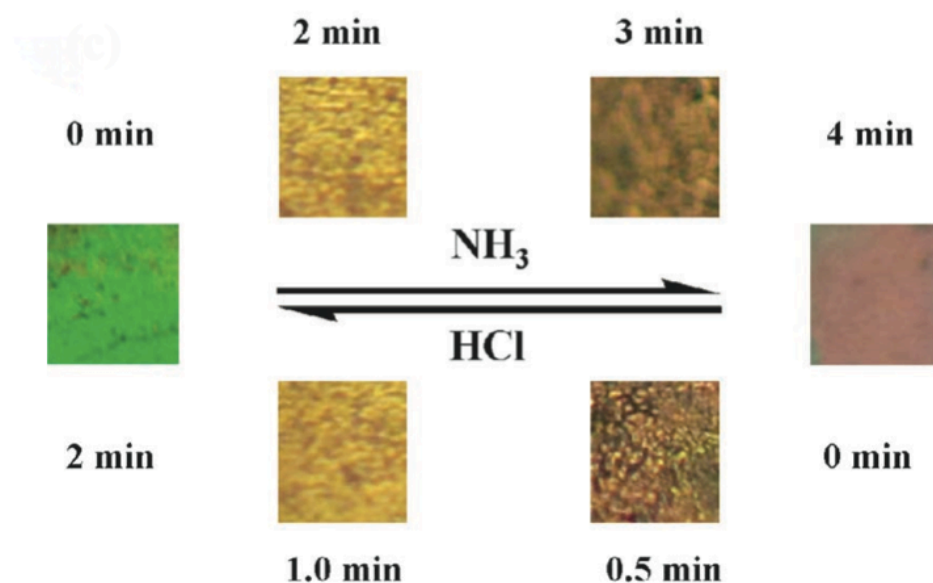
**Figura 7** - Incidência da luz a um determinado comprimento de onda segundo a equação de Bragg-Snell sofrendo difração ao propagar num cristal fotónico. (adaptado de Wang *et al* (84))

$$\text{Eq 1: } \lambda = 2D (n_{eff}^2 - \cos^2 \theta)^{1/2}$$

Esta classe especial de materiais pode ser preparada uni-, di- ou tridimensionalmente. Os DBR (*Distributed bragg reflector*) pertencem aos cristais fotónicos unidimensionais que consistem em camadas alternadas de dois materiais com diferentes índices de refração depositadas periodicamente num determinado substrato. (85) A periodicidade das multicamadas cria um potencial periódico para os

fotões de tal modo que certos fotões com energias específicas não podem propagar dentro do CF. O “*band gap*” fotónico resultante, chamado de “*stop band*”, resulta na reflexão dos fotões de determinado comprimento de onda, resultando no aparecimento de cor. (83, 88)

O ajuste da resposta dos cristais fotónicos a estímulos externos tem suscitado interesse em diversas comunidades científicas, para desenvolvimento de sensores. A abordagem de deteção baseia-se na utilização de CFs como filtros óticos sintonizáveis capazes de alterar as suas propriedades de refração quando em contato com uma substância de interesse ou quando expostos a estímulos externos, tais como campos elétricos e magnéticos, pH, entre outros. Cristais fotónicos para sensores térmicos em que o efeito termo-óptico se baseia na dependência do índice de refração com a temperatura e humidade foram obtidos usando dois materiais distintos, dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) mesoporoso e dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ), e formando filmes com diferentes camadas intercaladas em substrato de vidro. (83) O dióxido de titânio é um excelente material de revestimento óptico devido à sua elevada transparência acima de 350 nm e elevado índice de refração ( $n \approx 2.5$ ). Este já tem diversas aplicações industriais como a sua capacidade de autolimpeza em vidros (89), ActivTM (90) e HydrotechTM (91), antibacteriana (92) e como sensor de amónia. (93) Este último pode ser conseguido usando  $\text{TiO}_2$  juntamente com poli-anilina onde a variação de pH, de ácido para alcalino, resulta na alteração da cor de verde para vermelho (**Figura 8**).



**Figura 8** - Fotografias dos cristais fotónicos sujeitos a diferentes tempos de exposição em ambientes ricos de  $\text{NH}_3$  e  $\text{HCl}$ . (93)

Na presença de uma elevada concentração de  $\text{NH}_3$  a “*stopband*” do CF altera dos 556 nm para os 688 nm, resultando na mudança de cor de verde para vermelho. A presença de uma atmosfera rica em HCl promove a troca de cor novamente para verde. (93) Esta deteção a olho nu da alteração de cor consoante o teor de amónia poderá ser uma mais valia a nível alimentar se servir como sensor de amónia para avaliar a frescura do peixe.

#### 1.6.2.1.1.1 Indicadores tempo-temperatura

Os indicadores tempo-temperatura (ITTs) sofrem uma alteração visual aquando do empacotamento, processo este acelerado com o aumento da temperatura. Estes indicadores podem permitir ainda a monitorização das condições de armazenamento.

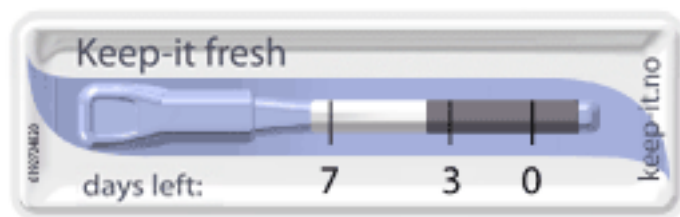
Os ITTs baseiam-se em processos físicos, químicos, enzimáticos ou biológicos. (94) Exemplos de ITTs comercializados são: *3M Monitor Mark* (**Figura 9**) e *Keep-it Fresh* (**Figura 10**). O primeiro contém um ácido gordo esterificado e um corante azul na mistura. A exposição a uma temperatura superior à temperatura limite leva à fusão do ácido gordo que se difunde pelo indicador causando a alteração da cor para azul. Esta alteração da cor é irreversível o que permite saber que o alimento foi exposto a temperaturas elevadas mesmo depois de ter sido arrefecido. A gama de temperatura (-15–26 °C) e a resposta do ITT são determinadas pelo tipo e concentração do éster.



**Figura 9** - Indicador de tempo-temperatura 3M Monitor Mark comercializado pela empresa 3M. Este ITT dá-nos a indicação do tempo a que o alimento esteve exposto a determinada temperatura, acima do limite máximo selecionado.

O segundo baseia-se numa reação química entre um reagente imóvel,  $\text{Fe}^{3+}$ , e um reagente móvel, ferrocianida, que estão selados em compartimentos distintos. A perda da separação entre os compartimentos e o contacto entre o reagente móvel e o imóvel e consequente alteração visual da cor são dependentes do tempo e temperatura. Este ITT foi desenvolvido para averiguar e assegurar os consumidores de

que o produto, quando armazenado a temperatura de refrigeração (4 °C), se encontra próprio para consumo. (74)



**Figura 10** - Indicador de tempo-temperatura comercializado pela empresa Keep it. A barra preta move-se ao longo do tempo e temperatura indicando os dias de prateleiras que restam para o alimento.

Os ITTs têm sido aplicados para avaliar a eficiência das pasteurizações. A compatibilidade destes indicadores com os polímeros utilizados na embalagem primária é crucial pois os ITTs são incorporados na embalagem do alimento. (95)

## 2 Enquadramento do trabalho

O trabalho descrito nesta dissertação foi parcialmente desenvolvido na forma de estágio curricular na Nutrigreen, S. A, sediada em Torres Novas – Santarém, tendo sido depois completado no departamento de Química da Universidade de Aveiro.

A Nutrigreen S. A. é uma empresa que se dedica à produção de purés e sumos de fruta. Os seus produtos são comercializados nas grandes superfícies nacionais, apostando também no mercado internacional. A Nutrigreen já recebeu reconhecimento internacional na 3ª edição da feira SIAL Middle East 2012, no Dubai, tendo ganho o prémio inovação pela produção de barras de fruta frescas, atrativas tanto pelo aspeto e facilidade de consumo no dia a dia como pela embalagem utilizada. Esta empresa participa regularmente em certames internacionais, na procura de novos mercados e tentando captar a atenção de potenciais clientes através dos seus produtos inovadores.

A associação dos frutos a alimentos saudáveis e essenciais a uma dieta equilibrada tem despertado uma atenção especial na indústria alimentar e nos próprios consumidores. A procura por produtos alternativos aos frutos frescos, inovadores e mais seguros microbiologicamente torna necessária o desenvolvimento de novos produtos alimentares no sector dos frutos, nomeadamente de saladas de fruta processadas.

Tipicamente, a preparação de saladas de fruta requer o corte da fruta e a imersão dos quadrados dos frutos numa solução aquosa, normalmente à base de sumo de fruta. Este processo é favorável à proliferação microbiana e promove também a ação enzimática diminuindo o tempo de vida da salada de fruta a apenas alguns dias.

Neste trabalho pretendeu-se:

- Desenvolver saladas de fruta de longa duração, mas que mantivessem as características do produto fresco. Estas saladas têm como objetivo serem **Saladas DuoFruta**, ou seja, permitam o consumo dos frutos sólidos e do sumo. Assim, foram estudadas saladas de fruta constituídas por diferentes conjugações de frutos e sumos, pasteurizadas a duas temperaturas diferentes e conservadas em condições térmicas distintas ao longo de três meses.

- Desenvolver um sensor de temperatura para avaliar de uma forma fácil e rápida a homogeneidade do tratamento térmico, de forma a assegurar que a salada

atingiu a temperatura mínima em todos os pontos, uma vez que a pasteurização é um fator crítico na conservação das saladas. Assim fizeram-se testes de conjugação de materiais fotônicos com diferentes índices de refração como o  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{BaTiO}_3$  e  $\text{SiO}_2$  para a preparação de sensores de temperatura com aplicabilidade alimentar em que por análise visual a embalagem se identificasse a eficiência e homogeneidade do tratamento térmico.

Com o desenvolvimento de uma salada de fruta, aliado a um eficaz controlo da temperatura atingida com uso do sensor de temperatura é possível obter um novo produto microbiologicamente seguro, com maior tempo de vida e com boas características sensoriais.

### **3 Metodologias**





### 3.1 Preparação das saladas de fruta

No presente trabalho foram realizadas três saladas de fruta durante o estágio efetuado na empresa *Nutrigreen, S. A*. Esse estágio teve a duração de 6 meses, e constituiu na preparação de três saladas de fruta diferentes, no seu processamento térmico a duas temperaturas (80 e 70 °C) e na realização de análises microbiológicas, sensoriais e de alguns dos parâmetros físico-químicos ao longo do armazenamento a 4 e 25 °C. Posteriormente o trabalho foi complementado no Departamento de Química e no laboratório associado CICECO da Universidade de Aveiro.

Na **Tabela 1** estão representadas as composições das diferentes saladas de fruta: salada 1 (S1), salada 2 (S2) e salada 3 (S3). Todos os frutos utilizados estavam armazenados no frio ( $\approx 4$  °C) com exceção dos frutos vermelhos utilizados na realização da S3 que, por não serem frutos sazonais, encontravam-se congelados.

**Tabela 1** - Composições das saladas de fruta.

S1	S2	S3
Maçã	Kiwi	Mirtilo
Uva	Laranja	Framboesa
Melão	Abacaxi	Morango
Manga	Manga	Maçã
Sumo de pera	Sumo de laranja	Sumo de maçã

Para a preparação das saladas de fruta acima referidas foram efetuados os seguintes passos:

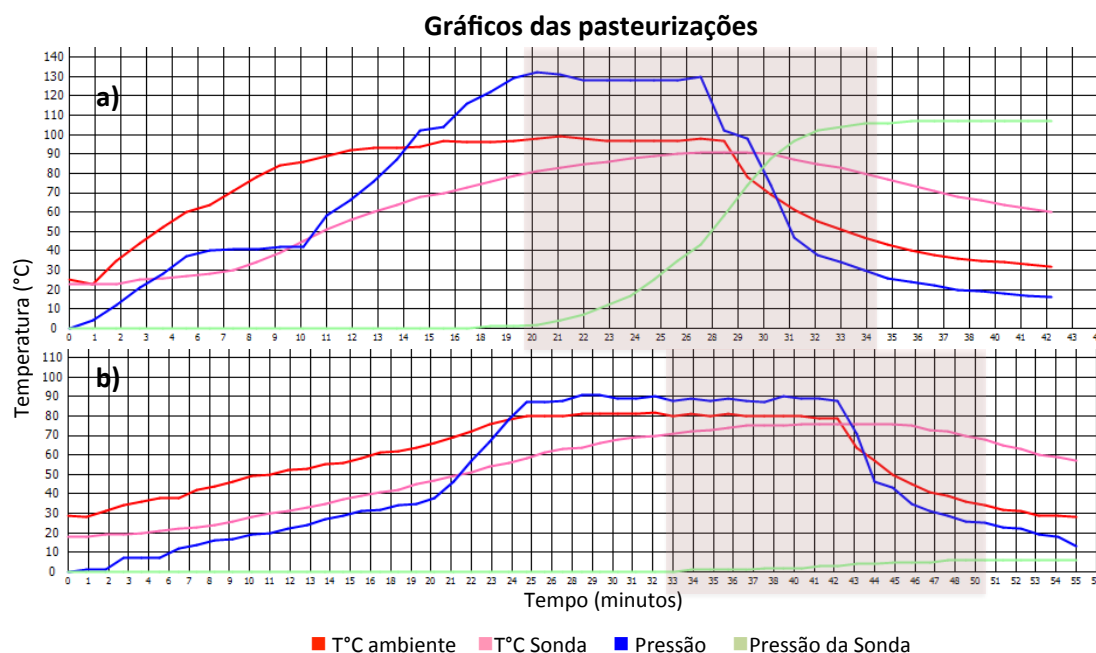
- Desinfecção dos utensílios utilizados (facas e colheres) com solução de hipoclorito de sódio ( $\text{Na}^+\text{ClO}^-$ ) antes da sua utilização. Os frutos com casca foram todos sujeitos a um banho de hipoclorito de sódio 50 mg/L durante 1 min antes do corte. O abacaxi foi sujeito a 2 banhos com casca e 1 sem casca devido à elevada carga microbiana que este fruto contém na casca. (96)
- Corte manual dos frutos em cubos com cerca de 0,5 cm de comprimento de aresta;
- Banho dos frutos em 5% de solução de *NatureSeal* ( $\sim 75\%(m/m)$ , de ascorbato de cálcio) durante aproximadamente 2 min de forma a impedir a oxidação e consequente escurecimento dos frutos cortados.

- Preparação das saladas em cuvetes utilizadas no embalamento das saladas de fruta desinfetadas com álcool etílico 96%(v/v) antes da sua utilização. Cada fruto foi pesado (15 g), num total de 60 g de fruta e enchimento com o sumo correspondente até perfazer 100 g. Estas pesagens foram feitas com uma balança *ScoutPro 4000g OHAUS*. As cuvetes com nome comercial de **Envahot 61** (136 mL, 84x45 mm) são constituídas por polipropileno (PP), polipropileno anidrido modificado (ADH) e copolímero de etileno e álcool vinílico (EVOH).
- Selagem das cuvetes, com o filme **Salepeel Hot 73** constituído por politereftalato de etileno (PET) e uma barreira co-estruturada com poliamida/EVOH/PP (AVPPP), efetuada com a **ILPRA seladora FoodPack, com modelo FPSpeedi (2006)**.

### 3.1.1 Tratamento térmico – Pasteurização

As saladas de fruta foram tratadas termicamente com duas pasteurizações diferentes, cuja diferença se cingiu no binómio tempo/temperatura a que a salada de fruta foi sujeita. O pasteurizador utilizado foi o **ILPRA termosaldatrici com modelo AU650/1800**.

O processo de pasteurização seguiu os seguintes passos: 1) Colocação das saladas de fruta no interior do aparelho. No interior de uma das saladas de fruta é colocada uma sonda para controlar a temperatura no interior da embalagem ( $T^{\circ}\text{C}$  da sonda); 2) Escolha do programa desejado, início do processo de enchimento de água e aquecimento até à temperatura pretendida ( $T^{\circ}\text{C}$  da sonda). A temperatura no interior do pasteurizador também é controlada ( $T^{\circ}\text{C}$  ambiente); 3) Atingida a temperatura desejada ( $T^{\circ}\text{C}$  da sonda) dá-se o início ao arrefecimento, onde a água existente no interior do aparelho é evacuada. Na **Figura 11** estão apresentados os gráficos relativos às pasteurizações efetuadas. O pasteurizador utilizado não permitiu controlar o tempo em que as saladas de fruta se encontravam a uma determinada temperatura, ou seja, não permitiu a realização de uma rampa de aquecimento específica e controlada da temperatura até se obter a temperatura máxima que era esperado atingir, podendo esta temperatura máxima atingida variar com os ciclos de pasteurização. Desta forma foi estabelecida uma temperatura mínima a que as saladas de fruta eram submetidas (80 e 70  $^{\circ}\text{C}$ ). Para ambas as pasteurizações, o tempo a que as saladas de fruta estiveram acima da temperatura pretendida foi de aproximadamente 15 min.



**Figura 11** - Gráficos das pasteurizações para a temperatura mínima de: a) 80 °C e b) 70 °C. Região a cor de rosa corresponde ao tempo a que as saladas estiveram acima da temperatura mínima estabelecida.

### 3.1.2 Análise dos parâmetros físico-químicos das saladas de fruta

De forma a estudar a estabilidade das saladas de fruta ao tratamento térmico e posterior armazenamento, foram avaliados diversos parâmetros bioquímicos (pH, acidez total titulável, índice de sólidos solúveis, teor de fenóis totais, teor de ácido ascórbico, capacidade antioxidante, escurecimento e o índice de cor) assim como a nível microbiológico e sensorial.

### 3.1.3 Armazenamento

As saladas de fruta, submetidas aos dois tratamentos térmicos, foram armazenadas em diferentes ambientes atmosféricos, nomeadamente a 4 e a 25 °C durante os 98 dias para o estudo do tempo de vida das saladas.

### 3.1.4 Periodicidade das análises

As saladas de fruta foram analisadas em diferentes fases: antes da pasteurização (NP), após a pasteurização (T0), após 7 dias (T7), após 14 dias (T14) e posteriormente de 14 em 14 dias até 98 dias (3 meses), fazendo um total de 10 análises para cada salada de fruta.

### 3.1.5 Tratamento das amostras

Para a determinação do pH, acidez total titulável e índice de sólidos solúveis as amostras foram transferidas para sacos assépticos e esmagadas manualmente. Para as restantes determinações (teor de fenóis totais, capacidade antioxidante, teor de ácido ascórbico, escurecimento e índice de cor) as amostras foram trituradas com o auxílio do almofariz e pilão e posteriormente centrifugadas durante 20 min a 4000 rpm (centrifuga Kubota 2010).

#### 3.1.5.1 Parâmetros microbiológicos

Para a análise microbiológica das saladas de fruta foram utilizados os seguintes meios de cultura:

- PCA (*plate count agar*) para crescimento de microrganismos aeróbios. Para a preparação do PCA foram pesadas 21,59 g de meio para 900 mL de água destilada.
- YGC (*yeast extract dextrose chloramphenicol agar*), meio de cultura seletivo para leveduras e bolores. Na preparação do YGC foram pesadas 36,0 g para 900 mL de água destilada.
- MRS (*lactobacillus MRS Brath*), meio de cultura seletivo para bactérias ácidas lácticas. Na preparação do MRS foram pesadas 44,63 g para 900 mL de água destilada.

Todos os meios foram esterilizados em autoclave (*tutnauer 2540 MLV*) e arrefecidos em estufa a 55 °C e espalhados em placas de petri.

A análise microbiológica foi efetuada, em duplicado, em todos os tempos de estudo e em ambas temperaturas de armazenamento, usando os diferentes meios.

Para esse efeito transferiu-se as saladas de fruta para sacos assépticos onde se esmagou a fruta misturando-a com o sumo. Retirou-se 1 mL da mistura do saco asséptico e espalhou-se na placa de petri com o respetivo meio. Todo este processo foi efetuado à chama e numa câmara de fluxo laminar. Deixou-se a incubar à temperatura ambiente durante 72 horas. Ao fim deste tempo registou-se o número de colónias.

#### 3.1.5.1 Determinação da atividade enzimática da peroxidase (POD)

A enzima foi extraída segundo o procedimento descrito por Chaikham *et al* (97) com algumas alterações. Desta forma, 20 mL de salada de fruta foram extraídas por adição de 50 mL de solução 0,05 M de tampão fosfato de hidrogénio de sódio

(Fluka) combinada com 0,1 M de cloreto de sódio (VWR chemicals). Todas as soluções foram mantidas sob agitação durante 30 min e posteriormente centrifugadas (Sigma , modelo 3k30) a 4500 g durante 30 min a 4°C.

A atividade da peroxidase foi determinada por espectrofotometria de UV/Vis (espectrofotômetro UV/Vis jenway 6405) com base no procedimento de Worthington *et al.* (98) Uma alíquota de 100 µL de extrato enzimático foi adicionada a 1,45 mL de solução de substrato (0,1 M tampão fosfato de sódio (pH 6,5), contendo 83,0 mM de fenol, 1,15 mM de 4-aminoantipirina e 0,95 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 25 °C. A absorvância ao comprimento de onda de 510 nm foi determinada a cada 5 min durante os 30 min iniciais. O método foi testado com a enzima comercial (*peroxidase from horseradish P-8250 tipo II*). Por não variação da absorvância nos 30 min iniciais, o tempo de reação foi prolongado para 24 h.

### **3.1.5.2 Análise Sensorial**

Todas as saladas de fruta, submetidas aos dois tratamentos térmicos e armazenadas a 4 e 25 °C, foram avaliadas ao longo dos 98 dias em NP, T0, T7, T14 e posteriormente de 14 em 14 dias até T98 por 4 provadores treinados. Esta avaliação consistiu na pontuação das saladas numa escalada de 1 a 4 dos seguintes parâmetros: cor, aroma, textura e sabor. As provas sensoriais foram avaliadas usando a folha de prova apresentada no **Anexo I**.

### **3.1.5.1 Índice de cor**

A cor da salada de fruta foi efetuada por determinação das coordenadas do espaço CIELab procedendo-se à determinação do espectro de transmitância entre 400 e 700 nm num espectrofotômetro (Perkin Elmer Instruments Lambda 35 UV/Vis) utilizando uma esfera de integração. A cor foi determinada usando o método CIELab onde o L\* indica a luminosidade, a\* indica a cromaticidade do verde (-) para o vermelho (+), e o b\* a cromaticidade do azul (-) para o amarelo (+). As determinações foram efetuadas em quadriplicado. (99)

### ***3.1.5.2 Índice de Escurecimento***

Para determinar o escurecimento foi efetuada a medição direta da absorvância das amostras a 420 nm. As amostras foram diluídas apropriadamente e os ensaios efetuados em triplicado usando o espectrofotômetro UV/Vis (biotek EON). (100)

### ***3.1.5.3 Determinação do pH***

O pH das amostras foi determinado, em duplicado, com o elétrico medidor de pH HANNA instruments.

### ***3.1.5.4 Determinação da acidez total titulável***

Para a determinação da acidez total titulável foram pesadas 25 g de amostra e perfiz-se o erlenmeyer de 250 mL até 100 g com água destilada. A titulação foi efetuada com solução de NaOH 0,25 N por potenciometria até se obter o pH de 8, com o auxílio do indicador de fenolftaleína. As análises foram feitas em duplicado. Para o cálculo da acidez usou-se a fórmula:  $\frac{(V_f - V_i)}{V_f} \times 0,064$  expresso em g/100g de ácido cítrico. (101)

### ***3.1.5.5 Determinação do índice de sólidos solúveis***

O índice de sólidos solúveis foi avaliado em °Brix a 20 °C utilizando um refratrômetro (RFM 340<sup>+</sup> (BS<sup>+</sup>)). As análises foram feitas em duplicado.

### ***3.1.5.6 Determinação do teor de compostos fenólicos totais***

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado segundo o método de Folin-Ciocalteu (Merck). (102) Adicionou-se 0,125 mL de amostra (apropriadamente diluída), 0,5 mL de H<sub>2</sub>O e 0,125 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Agitou-se e deixou-se reagir 5 min. Adicionou-se 1,25 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 75 g/L e 1 mL de H<sub>2</sub>O. Deixou-se reagir durante 90 min à temperatura ambiente. Leu-se a absorvância a 760 nm. Para a construção da reta de calibração (0,00-150 mg/L, R<sup>2</sup>=0,995) usou-se o ácido gálico como padrão sendo os resultados expressos em mg ácido gálico/L. As determinações foram efetuadas em triplicado usando o espectrofotômetro UV/Vis (biotek EON).

### **3.1.5.7 Determinação da capacidade antioxidante**

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método de descoloração de catião radicalar ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) (Sigma Aldrich). (103) A solução de ABTS radicalar foi preparada por reação de solução aquosa de ABTS com persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ) e deixou-se reagir no escuro durante 12 a 16 h. A solução de  $ABTS^{•+}$  foi diluída em etanol até se obter uma absorvância entre 0,700-0,800 a 734 nm. Num tudo de ensaio adicionou-se 1 mL de solução de ABTS e 50  $\mu$ L de amostra (apropriadamente diluída). Agitou-se e deixou-se reagir no escuro durante 15 min. Leu-se a absorvância a 734 nm. Para a reta de calibração (0,00-800  $\mu$ M,  $R^2=0,96$ ) usou-se como padrão o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Sigma-Aldrich) sendo os resultados expressos em mM de equivalentes de Trolox. As determinações foram efetuadas em triplicado usando o espectrofotômetro UV/Vis (biotek EON).

### **3.1.5.8 Determinação do teor de taninos hidrolisáveis**

O teor de taninos hidrolisáveis foi determinado segundo Chira *et al.* (104) Este método é baseado na reação de Bate-Smith, onde os taninos em meio ácido libertam antocianidinas ao serem aquecidos. Assim, 1 mL de amostra, apropriadamente diluída, foi adicionada a 0,5 mL de  $H_2O$  e 1,5 mL de 12 M HCl e a mistura foi homogeneizada. Dois tubos de cada amostra foram preparados: um foi aquecido durante 30 minutos a 100°C (amostra A), enquanto que outro foi mantido a temperatura ambiente, pelo mesmo tempo (amostra B). A cada tubo foi adicionado 0,25 mL de etanol 95%. A leitura das absorvâncias foi efetuada a 550 nm. O teor de taninos hidrolisáveis foi determinado usando uma reta de calibração obtida com uma mistura de oligômeros de procianidinas como padrão, de acordo com de Freitas *et al.* (105)

### **3.1.5.9 Determinação do teor de antocianinas monoméricas**

O teor de antocianinas nas amostras foi estimado usando o método de alteração de pH descrito por Burns *et al.* (106) Dois tubos foram preparados, cada um contendo 1 mL da amostra, apropriadamente diluída, e 1 mL de HCl 0,1%. Posteriormente, 10 mL de HCl 2% (pH 0,6) foram adicionados a um tubo e 10 mL de tampão fosfato/citrato (pH 3,5) adicionados no outro tubo. A leitura das absorvâncias

foi efetuada a 700 nm para corrigir possíveis erros e depois a 520 nm para determinar as antocianinas. As antocianinas foram quantificadas em mg cianidina-3-glucósido/L, sendo o coeficiente de extinção de  $\epsilon = 26\,900\text{ L cm}^{-1}\text{ mol}^{-1}$ . A  $\text{pH} < 1$  as antocianinas estão na sua forma vermelha permitindo a determinação total das antocianinas. A  $\text{pH}$  3,5 a forma das antocianinas está em equilíbrio com a forma incolor. Portanto, a esse  $\text{pH}$  a absorvância observada deve-se às antocianinas poliméricas. O teor de antocianinas livres é estimado pela diferença da absorvância entre  $\text{pH} < 1$  e  $\text{pH}$  3,5.

#### ***3.1.5.10 Determinação do teor de ácido ascórbico***

A quantificação do teor de ácido ascórbico nas saladas de fruta foi efetuada por método espectrofotométrico e colorimétrico usando o reagente 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP). Preparou-se uma solução de 36 mg/L de DCIP (Sigma) e uma solução padrão de ácido ascórbico a 0,100% (VWR) em ácido oxálico a 1% (Sigma). Leu-se a absorvância a 515 nm. Para a curva de calibração (0,00-80,0 mg/L,  $R^2=0,98$ ) usou-se como padrão o ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) sendo os resultados expressos mg de ácido ascórbico/L. As determinações foram efetuadas em triplicado usando o espectrofotômetro UV/Vis (biotek EON). Este método baseia-se numa oxido-redução onde o ácido ascórbico reduz o 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP). Este é um corante azul (meio ácido é básico ou neutro), cuja forma oxidada é rosa (meio ácido) e a reduzida incolor. Assim o ácido ascórbico (L-AA), é oxidado a ácido desidro-L-ascórbico (L-DHAA):  $\text{L-AA} + \text{DCIP}_{\text{oxidado}} \rightarrow \text{L-DHAA} + \text{DCIP}_{\text{reduzido}}$ . (107, 108)

#### ***3.1.5.11 Determinação de compostos voláteis por HS-SPME-GC-MS***

Os compostos voláteis existentes nas saladas de fruta foram analisados por microextração de fase sólida (HS-SPME) combinada com cromatografia gasosa unidimensional acoplada da espectrometria de massa (GC-q-MS). O dispositivo de SPME inclui uma fibra de sílica parcialmente interligada com 50/30 um revestimento de divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS). Inicialmente a fibra SPME foi condicionada durante 10 min a 250 °C. A amostra (10 mL) foi colocada em frascos de vidro de 25 mL. Após a adição de 2,0 g de NaCl (VWR chemicals) o frasco foi encapsulado com um septo PTFE/silicone. Este foi colocado num banho termostaticado ajustado a  $40,0 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  e em agitação constante. A fibra de



SPME foi manualmente inserida no espaço cabeça do frasco durante 10 min. Após este período, a fibra foi introduzida no injetor do GC a 250 °C (equipado com um “liner” com 0,75 mm de diâmetro interno) e mantido durante 3 min para desorção. Os compostos voláteis desorvidos foram separados usando o equipamento *Agilent Technologies 6890 Network gas chromatography* equipado com uma coluna capilar de sílica DB-FFAP (60 m x 250 µm x 0,25 µm) ligado ao detetor de massa *Agilent 5973 Network quadrupole mass selective detector*. O hélio foi usado como gás de arraste com um fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup> (pressão da coluna do espaço cabeça 12 psi). As injeções foram efetuadas em modo splitless (3 min). A temperatura do forno do GC foi programada da seguinte forma: a 40 °C durante 5 min, seguida por uma rampa de aquecimento a 2 °C min<sup>-1</sup> até 100 °C e de seguida subindo 5 °C min<sup>-1</sup> até aos 220 °C mantendo-se a esta temperatura por 2 min. Para o sistema MS, a temperatura da linha de transferência foi de 250°C. O impacto dos electrões para obtenção do espectro de massa foi efetuado a 70 eV e a ionização foi cerca de 30 uA. A aquisição foi feita em *full scan* (30-300 m/z) e a área do pico de cada composto foi obtida a partir do cromatograma obtido. A aquisição do sinal e o processamento dos dados foi efetuada usando o software HP ChemStation (Agilent Technologies). A identificação dos compostos voláteis foi conseguida por comparação dos tempos de retenção do GC e o respetivo espectro de massa de compostos padrão puros e também comparando os espectros de massa com a base de dados (NIST, 2005 software, Mass Spectral Search Program V.2.0d; NIST 2005, Washington, DC). (109)

### **3.1.6 Análise estatística**

Os resultados experimentais obtidos foram tratados com análise de variância unidirecional (ANOVA) com intervalo de confiança de 95% de forma a avaliar o efeito da temperatura de pasteurização e o efeito do armazenamento nas propriedades físico-químicas das saladas de fruta. Foi efetuado o teste de Tukey para identificar as diferenças significativas. Todos os dados experimentais foram analisados usando o software graphpad.

## 3.2 Preparação do sensor de temperatura

### 3.2.1 Nanopartículas com formato *core-shell*

#### 3.2.1.1 Síntese das nanopartículas de $\text{SiO}_2$

Para a síntese de nanopartículas de silício com  $\sim 360$  nm adicionou-se 1 mL de TEOS (tetraetilortossilicato, Sigma-Aldrich,  $>99,0\%$ ) numa mistura contendo 4 mL de água destilada, 1 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Sigma-Aldrich, 20-30%  $\text{NH}_3$ ) e 20 mL de 2-propanol (Sigma-Aldrich,  $>99,8\%$ ) à temperatura ambiente e sob agitação magnética. Deixou-se reagir durante 2, 4 e 24 h. Após estes tempos de reação as nanopartículas foram centrifugadas e lavadas com água destilada três vezes e, finalmente, ressuspendidas em 30 mL de água destilada. (110)

#### 3.2.1.2 Revestimento das nanopartículas de $\text{SiO}_2$ com $\text{TiO}_2$

Para o revestimento das nanopartículas de  $\text{SiO}_2$ , estas foram lavadas em etanol de forma a retirar a água para que o precursor de titânio não reagisse. Posteriormente o correspondente a 1/3 das nanopartículas sintetizadas (10 mL) foi adicionado a uma mistura contendo 0,12 M de *n*-butóxido de titânio (TBOT,  $\text{Ti}(\text{OC}_4\text{H}_9)_4$ , Sigma-Aldrich, 97%) e 0,45 M de água destilada sob refluxo de etanol (Riedel-de-Haen absoluto) a  $85^\circ\text{C}$  durante 2 h. As nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  revestidas com  $\text{TiO}_2$  foram centrifugadas e lavadas 3 vezes com etanol. Durante as lavagens, as amostras foram ultrasonificadas a 50 W durante 10 min de forma a evitar agregação das nanopartículas. (111)

### 3.2.2 Filmes fotônicos em multicamada de $\text{TiO}_2/\text{BaTiO}_3$ e $\text{SiO}_2$

#### 3.2.2.1 Síntese do filme de $\text{TiO}_2$

A síntese dos filmes de  $\text{TiO}_2$  foi adaptada de Castro *et al* (112). Os filmes foram preparados usando um método sol-gel e metodologia de auto-montagem induzida por evaporação. O co-polímero anfifílico em bloco Poli(1,4-butadieno-*b*-óxido de etileno) (PB51-*b*-PEO62, Polymer Source) com peso molecular  $M_{r_{PB}} = 51000$  g/mol e  $M_{r_{PEO}} = 62000$  g/mol foi usado como agente estruturante. Duas soluções foram preparada. A solução A consistiu na dissolução do polímero PB51-*b*-

PEO62 (30,0 mg) em etanol (119,86 mmol, Riedel-de Haen) a 70 °C durante 2 h. A solução B foi preparada a partir da mistura de 2,4-pentanediona (0,11 mmol, Fluka, >99,3% (v/v)) com *n*-butóxido de titânio (0,20 mmol, Merck, 98,0% (v/v)) sob agitação a temperatura ambiente. À solução B foi adicionado ácido acético glacial (8,93 mmol, Merck) à temperatura ambiente e mantido em agitação por 15 min. De forma a obter a solução final, a solução B foi adicionada à solução A. Os filmes de TiO<sub>2</sub> foram depositados por método de mergulho (*dip-coating*) em lamelas de vidro a duas velocidades: 45 mm.min<sup>-1</sup> e 96 mm.min<sup>-1</sup>. Todos os filmes foram termicamente tratados a 350 °C durante 5 min de forma a completar a condensação inorgânica (mesoestruturação) da matriz e decompor, parcialmente, o conteúdo orgânico. (112)

### **3.2.2.2 Síntese do filme de BaTiO<sub>3</sub> (~20 nm de espessura)**

Os filmes finos de BaTiO<sub>3</sub> foram preparados usando um método sol-gel e metodologia de auto-montagem induzida por evaporação. O polímero anfifílico PB51-b-PEO62 foi usado como agente estruturante. Três soluções foram preparadas: a solução A constituída pelo polímero PB51-b-PEO62 (30,0 mg) dissolvido em etanol (119,86 mmol) a 70 °C durante 2 h. A solução B foi preparada por dissolução de hidróxido de bário octa-hidratado (0,20 mmol, Merck, > 98,0% (v/v)) em ácido acético glacial (8,93 mmol) à temperatura ambiente. A solução C foi preparada a partir da mistura de 2,4-pentanediona (0,11 mmol) com *n*-butóxido de titânio (0,20 mmol) sob agitação a temperatura ambiente. De forma a obter a solução final, as soluções B e C foram adicionadas à solução A. Os filmes de BaTiO<sub>3</sub> foram depositados por *dip-coating* em lamelas de vidro a 96 mm.min<sup>-1</sup>. Todos os filmes foram termicamente tratados a 350 °C durante 5 min de forma a completar a condensação inorgânica (mesoestruturação) da matriz e decompor, parcialmente, o conteúdo orgânico. (112)

### **3.2.2.1 Síntese do filme de BaTiO<sub>3</sub> (~150 nm e 300 nm)**

Os filmes de BaTiO<sub>3</sub> foram preparados usando um método sol-gel e metodologia de auto-montagem induzida por evaporação. O polímero anfifílico Poli(estireno-b-óxido de etileno) (PS-PEO, Polymer Source) com peso molecular Mr<sub>PS</sub>= 59000 g/mol e Mr<sub>PEO</sub> = 72000 g/mol foi usado como agente estruturante. Três soluções foram preparadas: a solução A constituída pelo polímero PS-PEO (53,0 mg) e tetrahidrofurano (15,3 mmol, Sigma) dissolvido a 70 °C durante 2 h. A solução B foi

preparada por dissolução de hidróxido de bário octa-hidratado (0,85 mmol, Merck, pureza > 98,0% v/v) em ácido acético glacial (28,5 mmol) à temperatura ambiente. A solução C foi preparada a partir da mistura de 2,4-pentanediona (0,60 mmol) com *n*-butóxido de titânio (0,85 mmol) sob agitação à temperatura ambiente. De forma a obter a solução final, as soluções B e C foram adicionadas à solução A, onde, por último, foi adicionado o etanol (71,9 mmol) e deixado a agitar durante 20-30 min. Os filmes de BaTiO<sub>3</sub> foram depositados por *dip-coating* em lamelas de vidro a duas velocidades: 45 mm.min<sup>-1</sup> e 96 mm.min<sup>-1</sup> de forma a obter filmes com duas espessuras diferentes. Todos os filmes foram termicamente tratados a 400 °C durante 5 min de forma a completar a condensação inorgânica (mesoestruturação) da matriz e decompor, parcialmente, o conteúdo orgânico. (113)

### **3.2.2.2 Síntese de nanopartículas de SiO<sub>2</sub> (~60 nm)**

Para a síntese de nanopartículas de silício com ~60 nm adicionou-se 3,70 mL de TEOS numa mistura contendo 1,54 mL de água destilada, 3,66 mL de NH<sub>4</sub>OH e 100 mL de etanol à temperatura ambiente e sob agitação magnética. Deixou-se reagir 24 h. Após o tempo de reação as nanopartículas foram centrifugadas e lavadas com etanol três vezes e, finalmente, ressuspensas em 45 mL de etanol. (114)

### **3.2.2.1 Síntese do filme de SiO<sub>2</sub> (~46 nm)**

Os filmes de SiO<sub>2</sub> foram adaptados de Miao *et al* (115), e preparados usando um método sol-gel e metodologia de auto-montagem induzida por evaporação. O polímero anfifílico Pluronic F127 (EO100-PO65-EO100) com peso molecular Mr=12600g/mol foi usado como agente estruturante. A solução foi preparada adicionando ao polímero F127 (0,32 g), HCl 2M (0,4 mmol, VWR) e etanol (0,2 mol) deixando agitar por uns minutos. Posteriormente adicionou-se TEOS (0,83 mol, Sigma-Aldrich) e deixou-se dissolver por 30 min a 35 °C. Os filmes de SiO<sub>2</sub> foram depositados por *dip-coating* em lamelas de vidro a duas velocidades: 45 mm.min<sup>-1</sup> e 96 mm.min<sup>-1</sup>. Todos os filmes foram termicamente tratados a 400 °C durante 5 min de forma a completar a condensação inorgânica (mesoestruturação) da matriz e decompor, parcialmente, o conteúdo orgânico.

### **3.2.2.2 Síntese do filme de PDMS**

Os filmes de PDMS (poli(dimetilssiloxano)) foram realizados por junção do silicone (Sylgard 184 Silicone Elastomer Base) e agente de cura (Sylgard 184 Silicone Elastomer Curing Agent) na proporção de 10:1. Esta solução foi agitada de forma a obter uma mistura homogênea. Os filmes de PDMS foram depositados por técnica rotacional (*spin-coating*) sofrendo uma rotação de 80 segundos: 10 seg iniciais a 500 rpm, seguido de 10 seg a 2000 rpm e, por fim, 60 seg a 4000 rpm.

### **3.2.3 Caracterização morfológica das nanopartículas e filmes**

A micrografias de SEM tiradas às nanopartículas foram obtidas utilizando o microscópio Hitachi S-4100 com voltagem de aceleração 25.0 kV. As micrografias de SEM tiradas ao filmes em multicamada foram obtidas utilizando o microscópio Hitachi SU-70 com voltagem de aceleração 4.0 kV para avaliar a morfologia dos filmes à superfície. Para analisar os filmes em *cross section* o mesmo aparelho foi utilizado mas usando uma voltagem de 15.0 kV. O microscópio Hitachi SU-70 encontra-se acoplado com sistema de espectroscopia de energia dispersiva (EDS, Bruker Quantax 400) para análise elementar e mapeamento de elementos. Nestas últimas análises foi depositada uma camada de carbono nas amostras.

O tamanho das nanopartículas de SiO<sub>2</sub> e dos poros dos filmes de BaTiO<sub>3</sub> foi determinado usando o programa ImageJ (116) e a distribuição de tamanhos foi efetuada usando o programa estatístico Origin 8.5.1. Para esta distribuição foram utilizadas 150 partículas.

### **3.2.4 Testes do efeito fotônico por espectrofotometria no visível**

O espectro UV/Vis efetuados aos filmes foi adquirido a partir da determinação do espectro de transmitância, absorvância e refletância entre 250 e 900 nm num espectrofotômetro (espectrofotômetro UV/Vis Jasco V-560) utilizando uma esfera de integração.



## **4 Discussão de resultados**





#### 4.1 Estudo da pasteurização e do armazenamento nas propriedades físico-químicas das saladas de fruta

As três saladas de fruta: S1, escolhida como a salada nacional, e constituída por maçã, manga, melão, uva e sumo de pera; S2, contendo abacaxi, kiwi, manga, laranja e sumo de laranja e pensada como a salada de fruta mais tropical e acídica; e, por fim, S3, detentora dos frutos mais apreciados nos últimos anos e distintamente relacionados com o bem-estar e saúde dos consumidores – os frutos vermelhos, mirtilo, framboesa, morango juntamente com a maçã e sumo de maçã (**Figura 12**).



**Figura 12** – Fotografias das três saladas de fruta (S1, S2 e S3) realizadas no âmbito deste trabalho durante o estágio na empresa Nutrigreen, S. A. após o armazenamento durante 4 meses a 4 °C.

S1, S2 e S3 foram submetidas a dois tratamentos térmicos que diferiram na temperatura mínima atingida, 80 °C (pasteurização convencional e aplicada aos restantes produtos fabricados na empresa) e 70 °C durante 15 min. Esta última temperatura foi escolhida de forma a obter uma pasteurização a mais baixa temperatura e prevenir alterações organoléticas provocadas pela elevada temperatura no tratamento térmico dos alimentos. Contudo, temperaturas ainda mais baixas foram excluídas pois foi imperativo garantir que a temperatura mínima desejada alcançasse todos os pontos da salada de fruta, incluindo o interior dos cubos dos frutos de forma a ser suficiente para inativar os microrganismos e as enzimas.

As saladas foram armazenadas em duas condições diferentes, a 4 °C (temperatura de refrigeração) e a 25 °C (temperatura ambiente) durante 98 dias. Esta última temperatura de armazenamento é a temperatura a que os purés de fruta se encontram normalmente armazenados e estáveis durante pelo menos um ano. Assim, esta temperatura de armazenamento foi testada para averiguar se as saladas de fruta eram igualmente estáveis por um período longo de tempo.

#### 4.1.1 Inativação de enzimas e inibição dos microrganismos

A estabilidade das saladas de fruta foi avaliada por determinação do crescimento microbiano e da atividade enzimática de forma a verificar a eficácia da temperatura de pasteurização e o efeito do armazenamento na qualidade das saladas de fruta.

Na **Tabela 2** estão apresentadas as contagens em unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL) dos microrganismos aeróbios (MOA), bolores e leveduras (B&L) e bactérias ácidas lácticas (BAL) das saladas de fruta processadas a 70 e 80 °C e armazenadas a 4 e 25 °C.

As análises microbiológicas mostraram que a pasteurização a 80 °C foi eficiente na inibição do crescimento microbiano uma vez que os microrganismos presentes antes do tratamento térmico (MOA e B&L) deixaram de existir (ou estavam presentes em quantidade muito reduzidas, <10 UFC/mL) logo após tratamento térmico (T0). Durante o armazenamento, para ambas as temperaturas (4 e 25 °C), também não se verificou crescimento microbiano.

**Tabela 2** - Análise microbiológica de microrganismos aeróbios (MOA), bolores e leveduras (B&L) e bactérias ácidas lácticas (BAL) das saladas de fruta (S1, S2 e S3) pasteurizadas a 70 e 80 °C e armazenadas a 4 e 25 °C .

Inibição microbiana (UFC/mL)					
Pasteurização	Armazenamento	Tempo	MOA	B&L	BAL
S1	80 °C	NP	4x10 <sup>3</sup>	2x10 <sup>3</sup>	sc
		T0	sc	sc	sc
		T28	sc	30	sc
		T56	sc	sc	sc
		T98	sc	sc	sc
		NP	4x10 <sup>3</sup>	2x10 <sup>3</sup>	sc
		T0	sc	sc	sc
		T28	sc	1x10 <sup>3</sup>	sc
		T56	sc	sc	sc
		T98	sc	sc	sc
	70 °C	NP	4x10 <sup>3</sup>	2x10 <sup>3</sup>	sc
		T0	30	sc	sc
		T28	3x10 <sup>3</sup>	sc	sc
		T56	sc	sc	sc
		T98	sc	sc	sc
		NP	4x10 <sup>3</sup>	2x10 <sup>3</sup>	sc
	25	T0	30	sc	sc
		T28	1,5x10 <sup>3</sup>	sc	sc
		T56	sc	sc	sc
		T98	sc	sc	sc

<b>S2</b>	80 °C	4	T98	sc	sc	sc
			NP	$2,7 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	sc
			T0	10	sc	sc
			T28	sc	sc	sc
			T56	sc	sc	sc
			T98	sc	sc	sc
		25	NP	$2,7 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	sc
			T0	10	sc	sc
			T28	sc	sc	sc
			T56	sc	sc	sc
			T98	sc	sc	sc
	70 °C	4	NP	$2,7 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	sc
			T0	$2,7 \times 10^3$	sc	sc
			T28	$1,5 \times 10^3$	sc	sc
			T56	sc	sc	sc
			T98	sc	sc	sc
		25	NP	$2,7 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	sc
			T0	$2,7 \times 10^3$	sc	sc
			T28	$2,5 \times 10^3$	sc	sc
			T56	sc	sc	sc
			T98	sc	sc	sc
<b>S3</b>	80 °C	4	NP	$3 \times 10^3$	$0,4 \times 10^3$	sc
			T0	sc	sc	sc
			T28	sc	sc	sc
			T56	sc	sc	sc
			T98	sc	sc	sc
		25	NP	$3 \times 10^3$	$0,4 \times 10^3$	sc
			T0	sc	sc	sc
			T28	sc	sc	sc
			T56	sc	sc	sc
			T98	sc	sc	sc
	70 °C	4	NP	$3 \times 10^3$	$0,4 \times 10^3$	sc
			T0	$2,1 \times 10^3$	sc	sc
			T28	$0,7 \times 10^3$	sc	sc
			T56	sc	sc	sc
			T98	sc	sc	sc
		25	NP	$3 \times 10^3$	$0,4 \times 10^3$	sc
			T0	$2,1 \times 10^3$	sc	sc
			T28	$2 \times 10^3$	sc	sc
			T56	sc	sc	sc
			T98	sc	sc	sc

sc – sem crescimento, UFC – unidade formadora de colónias.

A pasteurização a 70 °C apenas foi eficiente para os B&L pois não se verificou o aparecimento de colónias após o tratamento térmico. No entanto, os microrganismos aeróbios não foram inibidos uma vez que houve aparecimento de colónias no armazenamento a 4 e 25 °C até ao 28º dia . Contudo o número de colónias

formadas em T0 e T28 nunca excedeu o número de colônias inicial, revelando que os microrganismos não estavam em proliferação, acabando depois por serem inibidos. Este número de colônias encontra-se dentro do limite aceitável para a qualidade microbiológica das saladas de fruta segundo o instituto de saúde Dr. Ricardo Jorge (117) que determina contagens inferiores a  $10^3$  UFC/mL como o limite satisfatório de qualidade microbiológica para saladas de fruta em calda e limite aceitável para contagens entre  $10^3$ - $10^5$  UFC/mL. Desta forma, e não encontrando informação adicional acerca da legislação nacional relativa ao limite aceitável de microrganismos em frutas e derivados conclui-se que as saladas de fruta submetidas a pasteurização a 70 °C, que apresentaram crescimento microbiano até ao 28º dia, se encontram microbiologicamente seguras, tendo a pasteurização sido eficiente.

Em todas as saladas não houve aparecimento de colônias de bactérias ácidas lácticas após 72 h de incubação em placas enriquecidas com meio propício ao crescimento desses microrganismos.

A **Tabela 3** mostra a atividade da enzima peroxidase (POD) das saladas frescas (NP) e após tratamento térmico (T0), para as duas pasteurizações, 80 e 70 °C. As pasteurizações inativaram em 74% e 98% a atividade da POD para a S1 pasteurizada a 80 e 70 °C, respetivamente, e 100% para S2 e S3. Esta enzima é utilizada como marcador para o tratamento térmico pois é estável a temperaturas elevadas, pelo que se assume que se a POD foi inativada, as restantes enzimas também estão inativas. (52, 66)

**Tabela 3** - Atividade enzimática da peroxidase (POD) das saladas de fruta (S1, S2 e S3) antes da pasteurização (NP) e após a pasteurização (T0) para pasteurização a 80 e 70 °C.

Atividade enzimática da peroxidase			POD ( $\Delta\text{abs h}^{-1}$ )	% inativação
S1	NP		$6,35 \times 10^{-3}$	-
	T0	80 °C	$1,65 \times 10^{-3}$	73,9%
		70 °C	$1,06 \times 10^{-4}$	98,3%
S2	NP		$1,73 \times 10^{-2}$	-
	T0	80 °C	0,00	100%
		70 °C	$4,45 \times 10^{-5}$	99,7%
S3	T0	NP	0,00	-
		80 °C	$4,35 \times 10^{-5}$	100%
		70 °C	0,00	100%

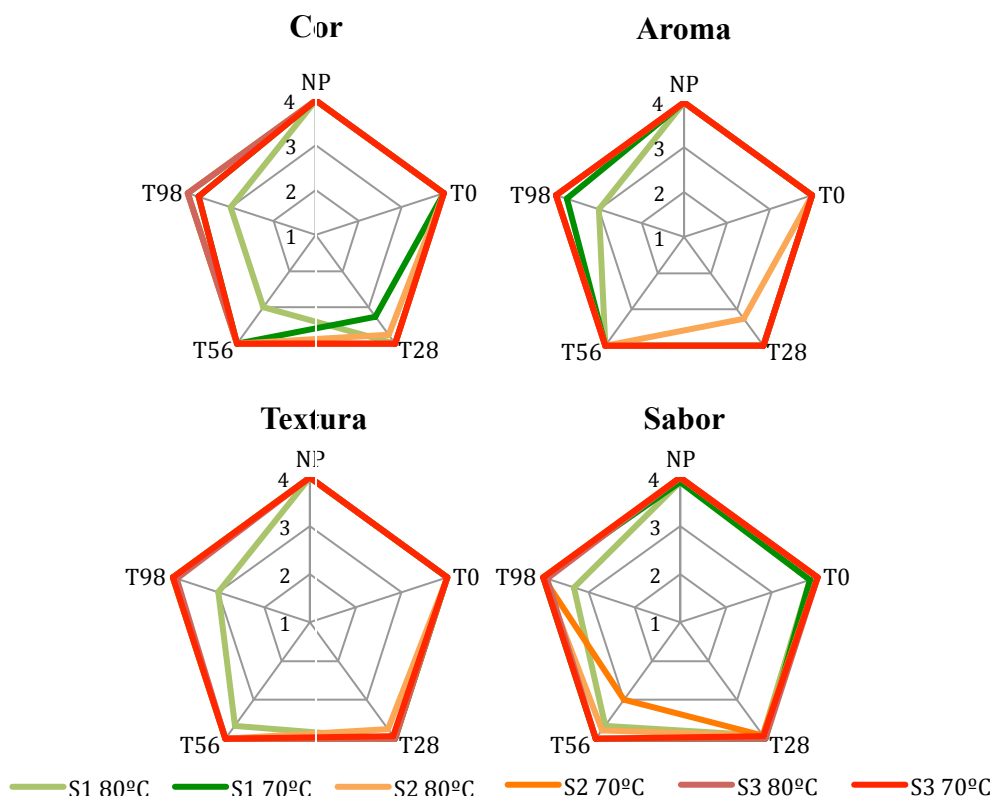
Os resultados demonstram que os dois tratamentos térmicos são eficientes tanto na inativação das enzimas presentes nos frutos, nomeadamente a PPO

(responsável pelo escurecimento dos fruto) e a PME e PG (responsáveis pela perda de textura), como na inibição da proliferação dos microrganismos aeróbios, bolores, leveduras e bactérias ácidas lácticas. Contudo, é de salientar S1 apresenta uma atividade residual da POD, 74% de inativação para S1 pasteurizada a 80 °C pelo que as enzimas podem apresentar ainda alguma influência na textura e cor da salada S1.

#### **4.1.2 Análise sensorial**

Ao longo dos 98 dias de estudo foram avaliados quatro parâmetros organoléticos – cor, aroma, textura, sabor. A classificação das saladas foi feita numa escala da 1 a 4 por provadores treinados da empresa Nutrigreen. S. A. Na **Figura 13** são apresentados os resultados da análise sensorial das saladas S1, S2 e S3 para ambas as pasteurizações, 80 e 70 °C, armazenadas a 4 °C.

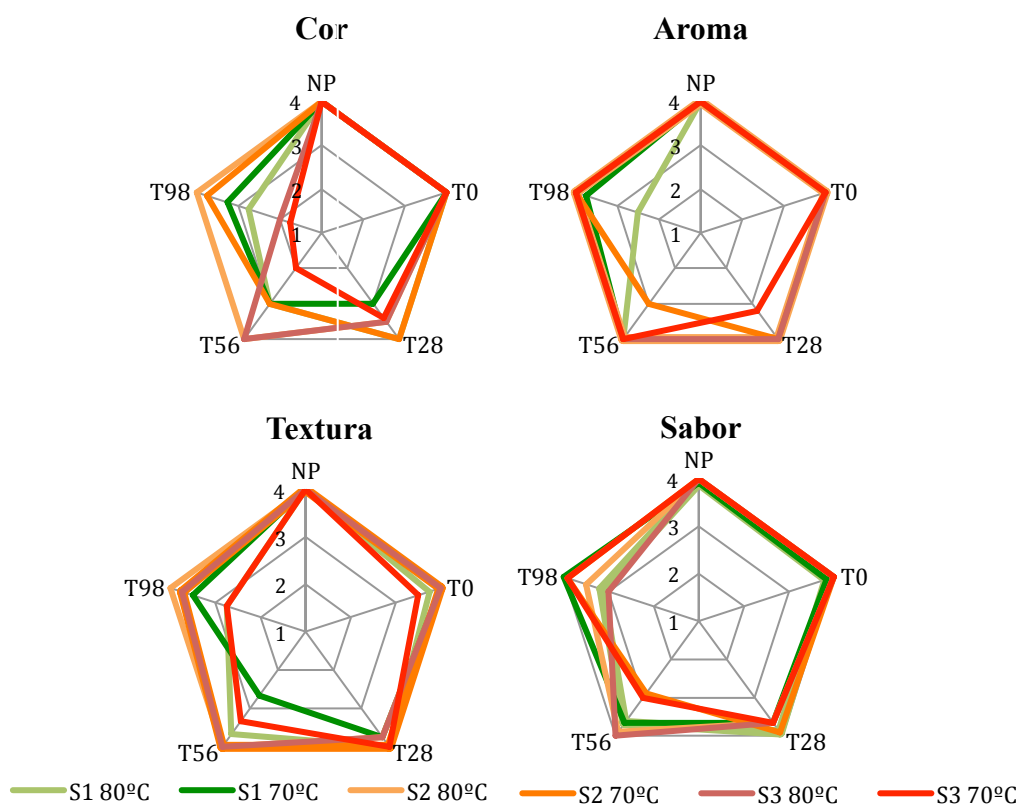
A qualidade das saladas S1, S2 e S3 não foi afetada organoleticamente pelo tratamento térmico apresentando a cotação de máxima (cotação 4) tanto nas saladas NP como nas T0. O armazenamento a 4 °C parece ter muito pouca influência nas características organoléticas das saladas, pelo que ao longo do tempo estas apresentam avaliação positiva ( $\geq 3$ ) até T98. Na cor é possível verificar que a S1 pasteurizada a 80 °C sofre uma descida na cotação (de 4 para 3) em T56 permanecendo com a mesma até T98. O mesmo não acontece com S1 pasteurizado a 70 °C, o que demonstra que o tratamento a menor temperatura tem menor influência no escurecimento da salada. No aroma e textura, S1 pasteurizada a 80 °C desceu 1 valor na cotação em T98 sendo, mais uma vez, a salada de fruta com pior classificação sensorial. Contudo, no aroma, S2 pasteurizada a 70°C apresenta uma descida da classificação em T28 (de 4 para 3), recuperando a classificação máxima em T56, permanecendo assim até T98. O sabor é o parâmetro que apresenta maiores oscilações em T56 e T98, embora ambos com classificação positiva ( $\geq 3$ ). Com isto conclui-se que S1 pasteurizado a 80 °C e armazenado a 4 °C é a salada menos estável sensorialmente pois apresenta classificações mais baixas a nível do sabor e da cor, parâmetros estes cruciais para a aceitação do consumidor. S3, pasteurizada tanto a 80 como a 70 °C, mostra ser a salada de fruta mais estável sensorialmente quando armazenada a 4 °C.



**Figura 13** - Análise sensorial das saladas S1, S2 e S3 sujeitas a pasteurizações a 80 e 70 °C e armazenadas a 4 °C durante 98 dias.

A análise sensorial relativa às saladas armazenadas a 25 °C (**Figura 14**) apresenta uma resposta sensorial bastante diferente das saladas armazenadas a 4 °C. De igual forma, a pasteurização não teve efeito imediato na alteração dos parâmetros sensoriais avaliados, pois NP e T0 apresentam a mesma classificação (cotação 4) para todas as saladas S1, S2 e S3 pasteurizadas tanto a 80 como a 70 °C. A cor é o parâmetro organolético mais afetado ao longo do armazenamento a 25 °C. Em T28 é possível verificar uma descida na cotação da cor para as saladas S1 e S3, contudo é a partir de T56 que se verifica o efeito da temperatura de armazenamento de 25°C na salada S3 pasteurizada a 70 °C pois esta passa a apresentar cotação de 2 até T98. S3 pasteurizada a 80 °C mantém a classificação de 4 em T56 descendo drasticamente para a cotação de 2 em T98. S3 é constituída por frutos vermelhos conhecidos por terem elevado teor de antioxidantes e compostos fenólicos, porém estes são sensíveis ao tratamento térmico sendo sujeitos a processos de oxidação e o consequente escurecimento. (22) Durante a pasteurização, a elevada temperatura permite a formação de vapores de água sob os frutos vermelhos que reduz a difusão de oxigénio impedindo o escurecimento dos frutos. Ao mesmo tempo, a desidratação causa danos

celular nos frutos que leva à quebra da parede celular. Estas alterações celulares são irreversíveis e podem promover a difusão dos compostos do interior do fruto para o meio envolvente, especialmente os compostos fenólicos. As antocianinas existentes em elevada quantidade nos frutos vermelhos da S3 difundem para o sumo devido ao tratamento térmico tornando-o avermelhado. A não existência da barreira de vapores no durante o armazenamento torna as antocianinas substrato para o oxigénio existente nas saladas permitindo a sua oxidação e a polimerização com os compostos intermediários das reações de acastanhamento contribuindo para o aparecimento da coloração acastanhadas das S3 ao longo do armazenamento. Este efeito foi mais visível nas S3 armazenadas a 25 °C, pois elevadas temperaturas potenciam as reações de acastanhamento. Assim, temperaturas iguais ou superiores a 25 °C não devem ser excedidas por longos períodos de tempo de forma a evitar o acastanhamento irreversível dos compostos. A elevada capacidade antioxidante é também crucial para estabilizar a cor a elevadas temperatura. (118, 119)



**Figura 14** - Análise sensorial das saladas S1, S2 e S3 sujeitas a pasteurizações a 80 e 70 °C e armazenadas a 25 °C durante 98 dias.

No aroma e sabor, o efeito da temperatura de armazenamento não foi tão evidente, pois no primeiro, S1 pasteurizada a 80 °C foi a única salada que apresentou diminuição na cotação em T98 (de 4 para ~2,5) e no segundo todas as saladas apresentaram cotação superior a 3 ao longo dos 98 dias. S1 e S3 pasteurizados a 70°C apresentaram oscilações na avaliação da textura. Ambas apresentaram cotação 4 até T28, S1 sofrendo uma descida na cotação em T56, recuperando em T98. Já S3 apresentou uma descida gradual (reduzida em T56) mas inferior a 3 em T98. Isto deveu-se ao uso de frutos congelados na realização da salada S3, pois o uso de frutos congelados (mirtilos, morango e framboesa) afetou *a priori* a textura dos frutos, que ao longo do armazenamento resultou na descida na classificação sensorial.

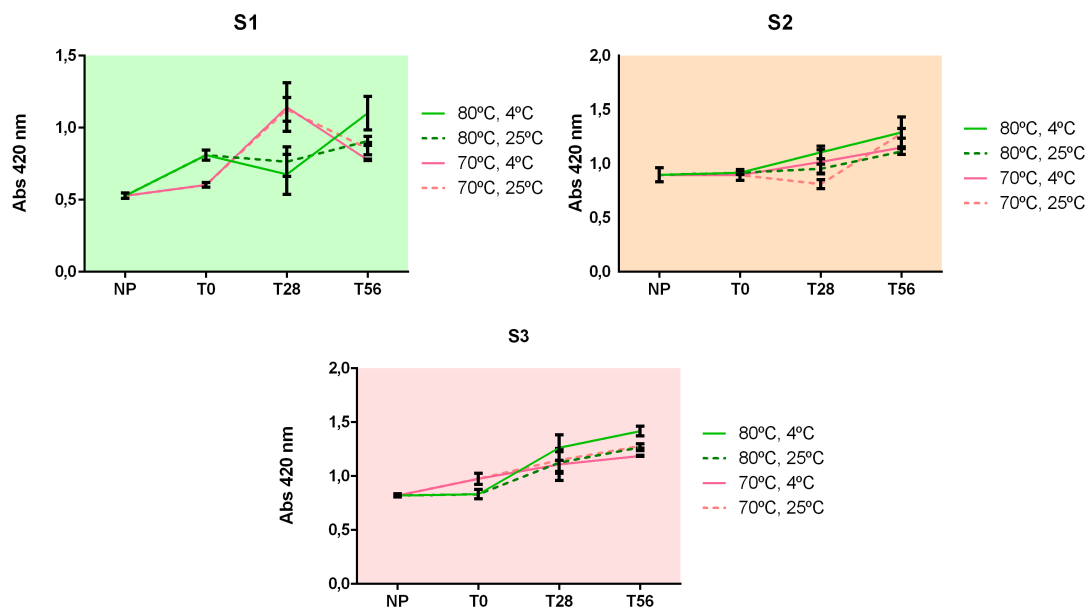
A partir das análises sensoriais efetuadas na empresa verificou-se que as saladas de fruta ao tempo de 98 dias já não apresentavam resultados aceitáveis a serem comercializados pelo que os parâmetros físico-químicos avaliados e apresentados seguidamente são apenas relativos a NP, T0, T28 (1º mês) e T56 (2º mês).

#### **4.1.3 Cor**

O escurecimento das saladas foi determinado por medição da absorvância a 420 nm. Na **Figura 15** é possível verificar um aumento desta absorvância ao longo dos 2 meses. As diferentes saladas pasteurizadas (80 e 70 °C) apresentam o mesmo comportamento relativo ao escurecimento ao longo do tempo de armazenamento, tanto a 4 como a 25 °C, à exceção de S1 pasteurizada a 70 °C.

S1 apresenta um aumento significativo da absorvância de NP para T0 ( $p<0,05$ ) de 35% e 14% para as saladas pasteurizadas a 80 e 70 °C, respetivamente. S3 também sofreu aumento significativo ( $p<0,05$ ) de 16% na absorvância a 420 nm nas saladas pasteurizadas a 70 °C. Isto demonstra que o tratamento térmico teve efeito imediato no escurecimento das saladas mencionadas anteriormente. S2 não apresenta alterações significativas de absorvância entre NP e T0.





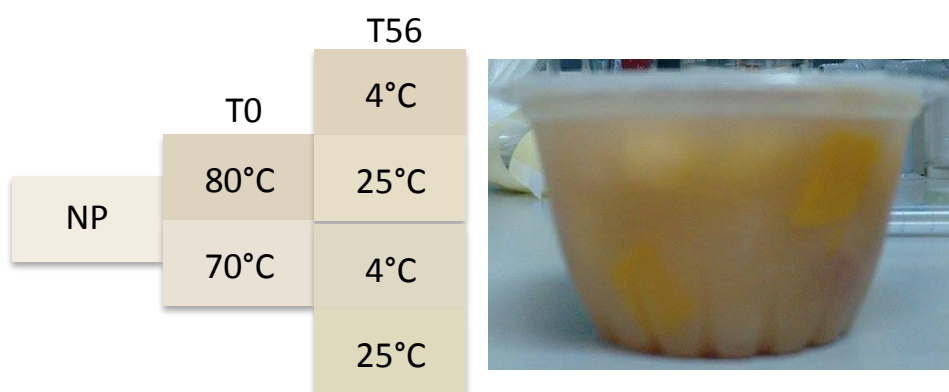
**Figura 15** - Índice de escurecimento (Abs 420 nm) das saladas S1, S2 e S3 submetidas às duas pasteurizações (80 e 70 °C) ao longo dos 56 dias de armazenamento, a 4 e 25 °C.

Um escurecimento progressivo foi observado ao longo do armazenamento a 4 e a 25 °C para todas as saladas. Este escurecimento é devido à ocorrência das reações de Maillard, pois como já foi referido anteriormente as enzimas que podiam ser responsáveis pelo escurecimento (PPO e POD) foram inativadas (74-100 % de inativação) pelo tratamento térmico. O tratamento térmico promove a reação entre os aminoácidos e açúcares redutores que existiam nas saladas levando à formação dos compostos intermediários incolores (produto de Amadori e/ ou Heynes). Durante o armazenamento, as reações de acastanhamento continuam a ocorrer resultando no aparecimento da coloração acastanhada. (18) Este aumento gradual é observado ao longo do tempo em S2 e S3 para ambos os tratamentos térmicos tanto nas saladas armazenadas a 4 como a 25 °C (**Figura 15**). S1 pasteurizada a 80 °C também apresenta um aumento da coloração acastanhada gradual ao longo do tempo, pois a redução da absorvância a 420 nm ao 1º mês demonstrou não ser significativa ( $p>0,05$ ). Já S1 pasteurizada a 70 °C não apresenta um comportamento linear, pois sofre um declínio de 47% e 32% de T28 para T56 para o armazenamento a 4 e 25 °C, respetivamente.

O modelo de cor CIELab foi usado para caracterizar a variação da cor das saladas de fruta durante os 56 dias de armazenamento, sendo o  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  os três eixos das coordenadas. A variação do eixo  $L^*$  mede as alterações da luminosidade entre branco ( $L=100$ ) e preto, ( $L=0$ ), o eixo  $a^*$  expressa a variação entre verde-

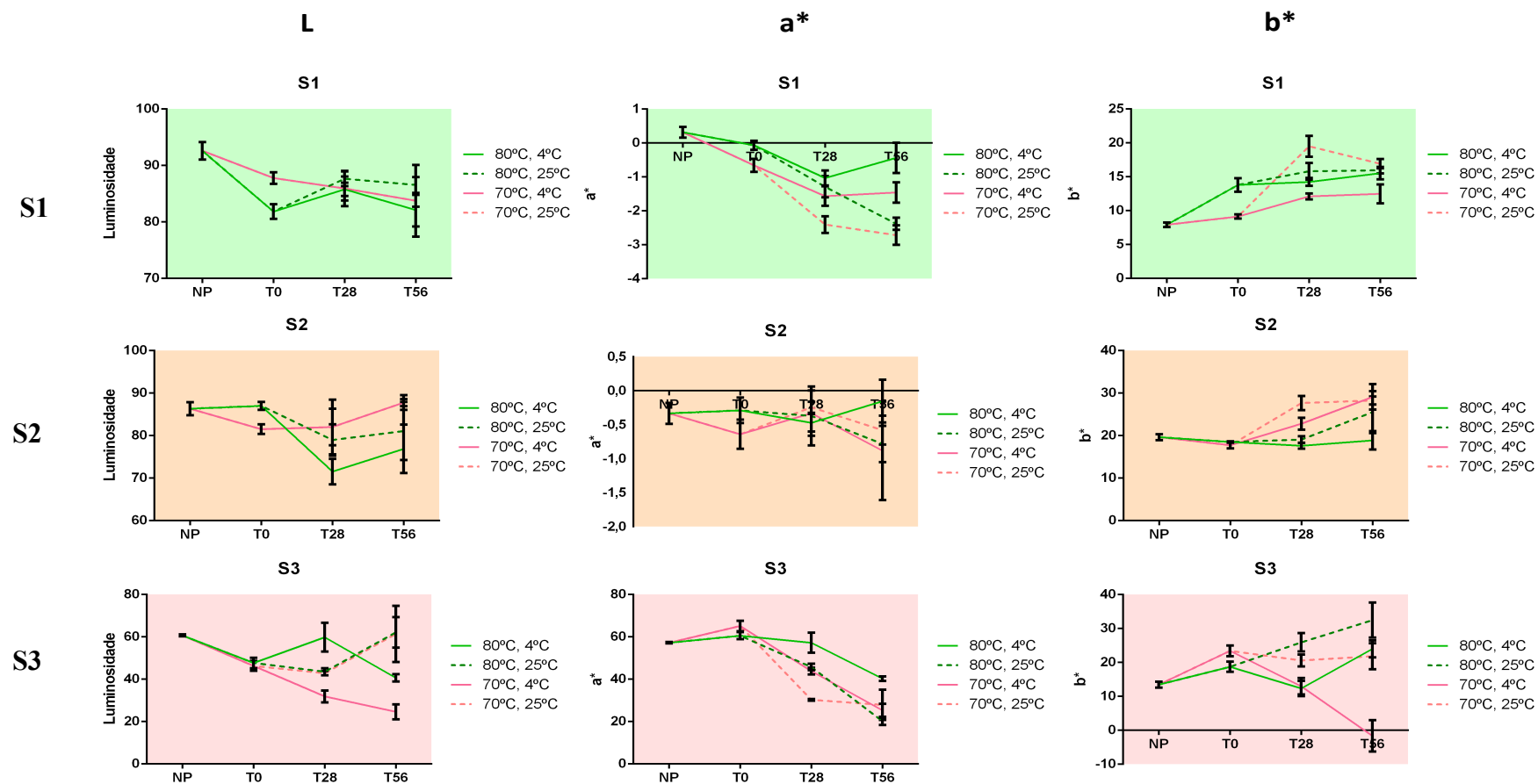
vermelho ( $-a^*/+a^*$ ) e o parâmetro  $b^*$  expressa a variação azul-amarelo ( $-b^*/+b^*$ ). Estes três parâmetros ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) foram calculados para as três saladas, pasteurizadas a 80 e 70 °C e armazenadas a 4 e 25 °C (**Figura 17**).

O tratamento térmico teve efeito imediato na cor da salada S1, pois o parâmetro  $L^*$  teve uma redução de 12% e 5%,  $a^*$  de 5% e 48% e  $b^*$  um aumento de 42% e 13%, para as saladas pasteurizadas a 80 e 70 °C, respectivamente. A mesma tendência foi verificada ao longo do armazenamento tanto a 4 como a 25 °C, para ambas as pasteurizações. Isto demonstra que a salada escureceu ( $L^*$  diminuiu), tornou-se mais verde ( $a^*$  diminuiu) e mais amarela ( $b^*$  aumentou). O aumento do  $b^*$  está normalmente associado à formação de compostos de oxidação e consequente aparecimento da coloração acastanhada. Na **Figura 16** estão apresentadas as cores das saladas frescas (NP), após pasteurização (T0) e após 56 dias de armazenamento a 4 e 25 °C para S1 pasteurizada a 80 e 70 °C, respectivamente.



**Figura 16** - Variação da cor da salada S1 pasteurizada a 80 e 70 °C e armazenada durante 56 dias a 4 e 25°C, e fotografia da salada S1 após o tempo de armazenamento após 4 meses de armazenamento a 4 °C.

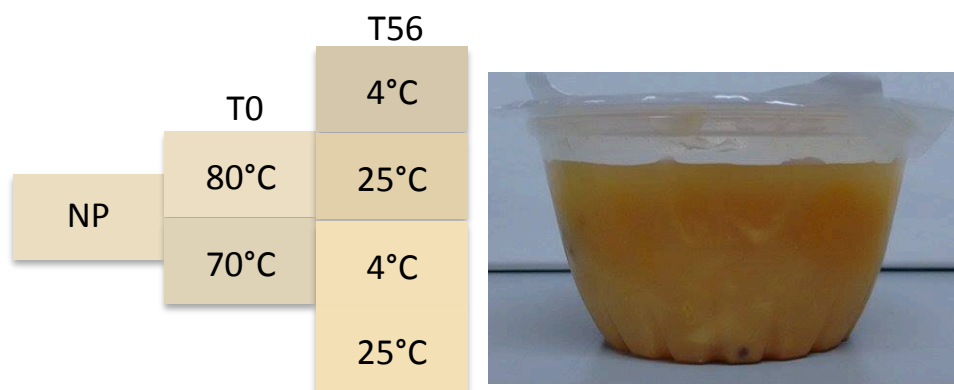
A partir da **Figura 16** é possível confirmar que S1 escureceu com o tratamento térmico, tendo a pasteurização a 80 °C tido maior impacto do que a pasteurização a menor temperatura. Após os 56 dias de armazenamento, S1 não apresentou escurecimento quando pasteurizadas a 80 °C e armazenadas a 4 e 25 °C. Já S1 pasteurizada a 70 °C apresenta escurecimento para ambas as temperaturas de armazenamento.



**Figura 17** – Apresentação dos valores de Luminosidade ( $L^*$ ), de  $a^*$  e de  $b^*$  para determinação do índice de cor das saladas S1, S2 e S3 submetidas às duas pasteurizações (80 e 70 °C) ao longo dos 56 dias de armazenamento a 4 e 25 °C.



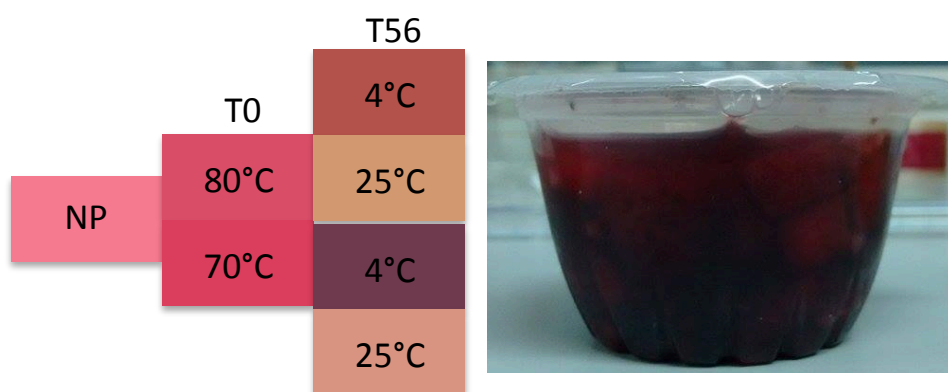
Em S2, ao contrário do observado na **Figura 15**, que indicava que S2 não sofreu escurecimento imediato potenciado pela pasteurização, a análise por CIElab indica que S2 escureceu: os valores de  $a^*$  sofreram um aumento de 5% quando pasteurizadas a 80 °C e uma redução de 48% após a pasteurização a 70 °C; os valores de  $L^*$  sofreram um aumento de 1% para as saladas tratadas a 80 °C e uma redução de 6% após pasteurização a 70 °C; já os valores de  $b^*$  mantiveram-se constantes. Isto sugere que S2 escureceu pois perdeu luminosidade ( $L^*$  diminuiu) e tornou-se menos vermelha ( $a^+$ ) e mais verde ( $a^-$ ) ( $a^*$  diminuiu). A S2 é a salada que demonstra ter maior estabilidade na cor (**Figura 17**) pois os valores de  $L^*$  e  $a^*$ , embora apresentem oscilações, não diferem significativamente ( $p>0,05$ ) entre pasteurizações e temperaturas de armazenamento. O valor de  $b^*$  já apresenta um aumento significativo ( $p>0,05$ ) após os 56 dias de armazenamento de 27% para a S2 pasteurizada a 80 °C e armazenadas a 25 °C, e de 39% e 37% para a S2 pasteurizada a 70 °C e armazenadas a 4 e 25 °C, respetivamente. À exceção do escurecimento da S2 pasteurizada a 80 °C e armazenada 56 dias a 4 °C, as restantes variações de cor apresentadas na **Figura 18**, estão de acordo com os resultados discutidos anteriormente.



**Figura 18** - Variação da cor da salada S2 pasteurizada a 80 e 70 °C e armazenada durante 56 dias a 4 e 25 °C, e fotografia da salada S2 após o tempo de armazenamento após 4 meses de armazenamento a 4 °C.

A salada de frutos vermelhos - S3 – como seria de esperar apresenta valores de luminosidade inferiores a S1 e S2 dado que a sua tonalidade avermelhada lhe confere um tom mais escuro. O tratamento térmico demonstrou ter influência direta na cor de S3 pois resultou numa redução em 27% e 31% para os valores de  $L^*$ , aumento de 5% e 12% para os valores de  $a^*$  e num aumento de 28% e 42% para os valores de  $b^*$ , relativamente à pasteurização a 80 e 70 °C, respetivamente. Estas variações resultam no escurecimento da S3 (que vai de encontro com o aumento da

absorvância a 420 nm analisado na **Figura 15** para a pasteurização efetuada a 70 °C) e com a variação da cor apresentada na **Figura 19**. Ao longo do armazenamento S3 apresenta um comportamento diferente na S3 pasteurizada a 80 °C comparativamente à pasteurizada a 70 °C. Nesta última, quando armazenada a 4 °C, é verificada uma descida gradual da luminosidade ao longo do tempo, que não é observada na salada armazenada a 25 °C e pasteurizada a 80 °C. Já os valores de  $a^*$  e  $b^*$  apresentam a mesma tendência para ambas as temperaturas de armazenamento tanto na salada pasteurizada a 80 °C como na pasteurizada a 70 °C sendo a descida de  $a^*$  e o aumento de  $b^*$  gradual e significativo ( $p < 0,05$ ) de T0→T56, à exceção da salada pasteurizada a 70 °C e armazenadas a 4 °C que sofreu uma redução de  $b^*$  de T28→T56 sugerindo que esta ficou mais azul ( $b^*$  negativo). Este resultado é comprovado pela **Figura 19**, onde é possível verificar que as coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  resultaram numa cor mais violeta para a S3 pasteurizada a 70 °C e armazenada a 4 °C.

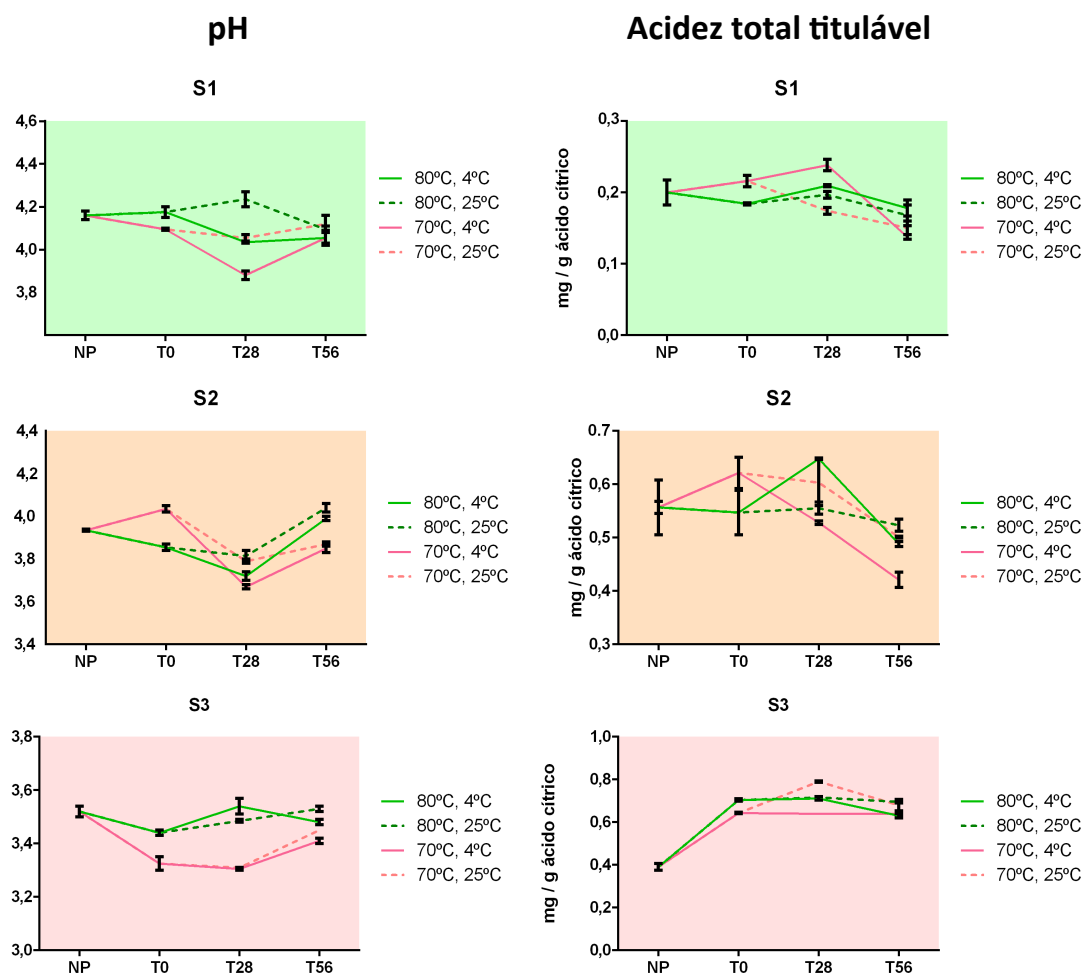


**Figura 19** - Variação da cor da salada S3 pasteurizada a 80 e 70 °C e armazenada durante 56 dias a 4 e 25 °C, e fotografia da salada S3 após o tempo de armazenamento após 4 meses de armazenamento a 4 °C.

É de salientar que os valores de  $b^*$  em S3 são os mais altos comparativamente com S1 e S2. Isto é também provado pela cor observada na **Figura 19** relativa às saladas armazenadas ao 56º dia, onde as saladas armazenadas a 25 °C já apresentam tonalidade acastanhada, resultado da oxidação dos compostos fenólicos, principalmente as antocianinas e do excesso de compostos acastanhados resultantes das reações de Maillard, que por sua vez, foram potenciadas pelo armazenamento a temperatura mais elevada (25 °C). (120) Estes resultados estão de acordo com a análise sensorial das saladas de fruta armazenadas a 25 °C (**Figura 14**) cuja avaliação organolética da cor é negativa.

#### 4.1.4 pH e acidez total titulável

Dada a natureza dos frutos que compõem as diferentes saladas, o pH das saladas frescas (NP) era de ~4,15, 3,95 e 3,50 para as saladas S1, S2 e S3, respetivamente (**Figura 20**). Para S1 tratamento térmico resultou no aumento do pH, embora não significativo, na salada pasteurizada a 80 °C, e numa diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) ( $pH \sim 4,1$ ) para a salada pasteurizada a 70 °C. O oposto se sucedeu com S2 cuja pasteurização a 80 °C resultou na diminuição ( $p < 0,05$ ) do pH para 3,85 e a pasteurização a 70 °C aumentou ( $p < 0,05$ ) o pH para 4,05. S3, contrariamente a S1 e S2 apresenta a mesma tendência para ambas as pasteurizações, apresentando uma diminuição do inicial (pH 3,5) para 3,45 e 3,3 para a salada pasteurizada a 80 e 70 °C, respetivamente. O facto de todas as saladas apresentarem  $pH \leq 4,5$  deve-se à presença dos ácidos orgânicos existentes nos frutos, como o ácido málico nas maçãs (existente na S1 e S3), tartárico nas uvas (S1) e o ácido cítrico existente no abacaxi (S1 e S2) e na laranja (S2). O aumento ou redução do pH com o tratamento térmico deve-se à destruição ou libertação dos ácidos da parede celular dos frutos. O tempo de armazenamento e o ambiente atmosférico a que as saladas foram submetidas (4 e 25 °C) tem influência no pH destas, sendo que após 56 dias de armazenamento, S1 apresenta uma redução de 3% e 2% para a salada pasteurizada a 80 °C e armazenada a 4 e 25 °C, e uma redução de 1% para ambas as saladas pasteurizadas a 70 °C. Esta redução ao longo do tempo deveria refletir-se com o aumento da acidez de S1, o que não é comprovado pois a acidez também diminuiu em S1. Em S1 existem descidas de pH significativas de 4% entre T0→T28 na salada de fruta pasteurizada a 80 °C e armazenada a 4 °C, assim como na armazenada a 25 °C de T28→T56 (descida de 3%). A salada pasteurizada a 70 °C e armazenada a 25 °C não sofreu variações de pH significativas, já na salada armazenada a 4 °C o pH desceu significativamente 6% no primeiro mês (T28).



**Figura 20** - Variação do pH e da acidez total titulável das saladas S1, S2 e S3 submetidas às duas pasteurizações (80 e 70 °C) ao longo dos 56 dias de armazenamento, a 4 e 25 °C.

Na S2 a descida do pH é significativa em todos os tempos de armazenamento (T0→T28, T28→T56), porém há um aumento entre T0 e T56 para a salada pasteurizada a 80 °C e armazenada a 4 e 25 °C, de 4% e 25%, respectivamente. Em T56 a salada pasteurizada a 70 °C sofreu uma redução de 5% e 4% para a salada armazenada a 4 e 25 °C relativamente a T0.

S3 é a salada de fruta com pH mais estável ao longo do tempo pelo que as variações significativas apenas se verificaram num aumento de T0→T28 (3%) na salada armazenada a 4 °C para a pasteurização a 80 °C e um aumento de T28→T56 (1%) para ambas as saladas armazenadas a 4 e 25 °C após pasteurização a 70 °C.

A salada com valores de pH mais baixos é a S3 constituída por frutos vermelhos (mirtilos, morangos e framboesas) conhecidos pelo elevado teor de compostos fenólicos, que são compostos acídicos e juntamente com os ácidos orgânicos resultam na elevada acidez de S3. Esta acidez oscilou entre 0,3904-0,7904 mg/g ácido cítrico (22), tendo um aumento gradual ao longo dos 56 dias para ambas



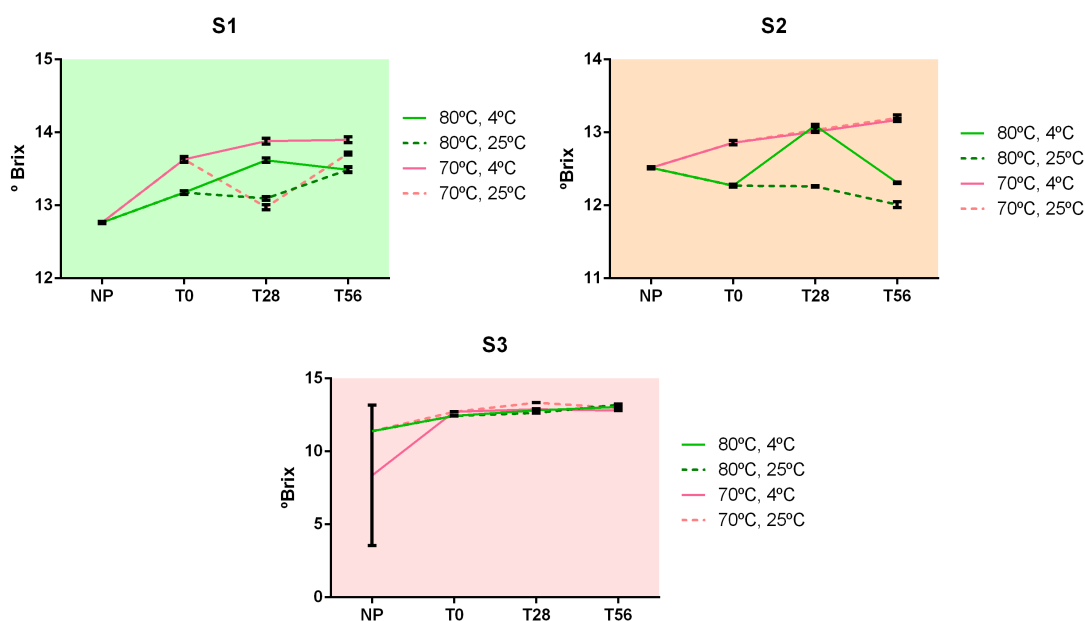
as pasteurizações e temperaturas de armazenamento. A pasteurização despoletou a libertação dos compostos acídicos, nomeadamente os compostos fenólicos da parede celular dos frutos para o meio envolvente devido às temperaturas elevadas resultando no aumento significativo de cerca de 0,3 mg/g ácido cítrico. Para as restantes saladas S1 e S2, respetivamente, a pasteurização resultou na diminuição (9% e 1%) da acidez nas saladas pasteurizadas a 80 °C e aumento (7% e 10%) da acidez nas saladas pasteurizadas a 70 °C. Esta diferença pode dever-se aos 10 °C que diferem nas pasteurizações pelo que a menor pasteurização os 70 °C poderá ter promovido apenas a libertação dos ácidos orgânicos e compostos fenólicos existentes no interior das paredes e consequente aumento da acidez, já os 80 °C para além de libertarem os compostos do interior do fruto poderão ter resultado na sua destruição por excesso de temperatura. De um modo geral, após os 56 dias de armazenamento, S1 apresentou uma redução de 3% e 9% para a salada pasteurizada a 80 °C quando armazenada a 4 °C e 25 °C e uma redução de 56% e 43% para a salada pasteurizada a 70 °C, a 4 e 25 °C, respetivamente.

Ao final dos 56 dias de armazenamento, S2, apresentou uma redução da acidez de 12% e 4% para as saladas pasteurizadas a 80 °C e 47% e 20% para as saladas pasteurizadas a 70 °C, quando armazenadas a 4 e 25 °C, respetivamente. As diminuições da acidez ao longo do armazenamento podem dever-se à copolimerização dos ácidos orgânicos com açúcares redutores ou produtos intermediários das reações de acastanhamento promovendo a formação de compostos acastanhados, denominados de melanoidinas.

Desta forma conclui-se que a temperatura de pasteurização não foi suficiente para estabilizar o pH e a acidez. A estabilidade das saladas difere consoante a pasteurização a que foram sujeitas, sendo que S1 parece ser mais estável quando pasteurizada a 80 °C, S2 não apresenta estabilidade em qualquer uma das pasteurizações e/ou temperaturas de armazenamento, já S3 mostra-se estável em qualquer pasteurização e temperatura de armazenamento. No entanto, mesmo as diferenças de pH tendo sido significativas ao longo do armazenamento e possam ser relacionadas a um possível crescimento de microrganismos, a suspeita de atividade microbiana é excluída pela análise microbiológica efetuada e analisada anteriormente.

#### 4.1.5 Índice de sólidos solúveis

Nos frutos a determinação do °Brix é usado para indicar a percentagem de sólidos solúveis existentes nestes, um dos fatores mais importantes para garantir a qualidade nos frutos e derivados. (118) Os microrganismos que causam degradação dos sumos e das saladas de fruta consomem os açúcares podendo levar à diminuição dos valores de °Brix. (121) A pasteurização vem desta forma inibir o crescimento microbiano e inativar as enzimas pectina metilesterase (PME) e poligalaturonase (PG), responsáveis pela perda de textura e consistência dos frutos, e consequente degradação da parede celular, resultando no aumento de polissacarídeos de menores dimensões resultando no aumento de °Brix. Na **Figura 21** está presente o efeito da pasteurização (80 e 70 °C) e do armazenamento ao longo de 56 dias (4 e 25 °C) no teor de índice de sólidos solúveis para as saladas S1, S2 e S3.



**Figura 21** - Variação do índice de sólidos solúveis das saladas S1, S2 e S3 submetidas às duas pasteurizações (80 e 70 °C) ao longo dos 56 dias de armazenamento, a 4 e 25 °C.

A pasteurização teve efeito imediato no teor de sólidos solúveis resultando num aumento de 3% e 6% para S1 pasteurizada a 80 e 70 °C, na diminuição de 2% e aumento de 3% para S2 pasteurizada a 80 e 70 °C, e aumento de 8% e 34% para S3 pasteurizada a 80 e 70 °C. Estes aumentos deveram-se resultaram do uso de elevadas temperaturas ( $T > 70$  °C) que promoveram a degradação da parede celular dos frutos . Esta degradação resultou na libertação de polissacarídeos pécticos, contribuindo para a solubilização e degradação da pectina.

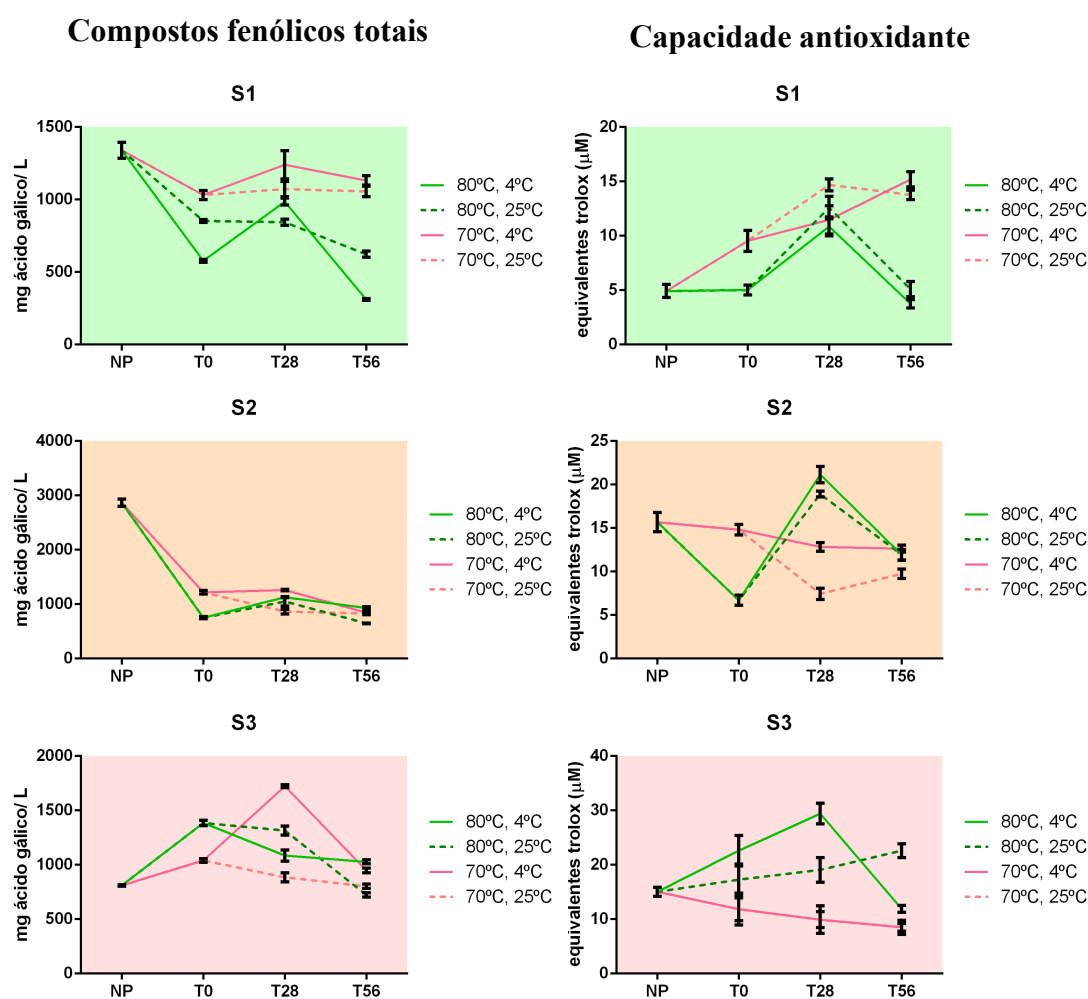
Esta degradação origina uma diminuição do peso molecular e consequente perda de funcionalidade. A perda de textura por aquecimento nos frutos ácidos pode estar relacionada com a hidrólise ácida das ligações glicosídicas nos polissacarídeos da parede celular em que a hidrólise do ácido poligalacturónico ocorre mais rapidamente que a hidrólise dos polissacarídeos neutros. Em condições ácidas, os ácidos urónicos e os açúcares neutros são os primeiros compostos a ser perdidos da parede celular após aquecimento. A  $\beta$ -eliminação é outro mecanismo não enzimático responsável pela degradação da pectina. Esta reação é potenciada pela temperatura, grau de metilação e baixo pH e consiste na remoção de um átomo de hidrogénio no carbono 5 e do carbono 4 dos resíduos de ácido galacturónico, levando à formação de compostos insaturados que absorvem a 235nm. (122) Estes mecanismos não enzimáticos de degradação da pectina justificam o aumento do índice de sólidos solúveis ao longo do tempo, pois as enzimas responsáveis pela degradação da parede celular (PME e PG) estão inativadas.

Comparando os tempos de armazenamento, S1 e S3 apresentam o mesmo comportamento, tendo um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos °Brix de T0 até T56, sendo este comportamento similar tanto a 4 como a 25 °C, concluindo que a temperatura de armazenamento não influencia os sólidos solúveis existentes nas saladas.

#### **4.1.6 Teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante**

Os compostos fenólicos encontram-se, geralmente, no interior das paredes celulares dos frutos assim como nos vacúolos. A maioria dos compostos fenólicos encontra-se normalmente complexada com outros compostos não se encontrando na forma livre. O tratamento térmico, quebra as paredes celulares dos frutos promovendo a libertação e biodisponibilidade dos compostos fenólicos. Na **Figura 22** está presente a estabilidade dos compostos fenólicos e a capacidade antioxidante das saladas S1, S2 e S3 relativamente ao tratamento térmico (80 e 70 °C) e ao armazenamento (4 e 25 °C) ao longo de 56 dias. Em S1 a temperatura de pasteurização condicionou a perda para metade do teor de compostos fenólicos totais na salada pasteurizada a 80 °C, e em 30% na salada pasteurizada a 70 °C. Já S2 sofreu uma redução para um quarto e para metade quando sujeitas a tratamento térmico a 80 e 70 °C, respetivamente. Assim, verifica-se que o uso de mais 10 °C no

processo de pasteurização é prejudicial e conduz a uma maior perda de compostos fenólicos. Esta redução imediata deve-se à sensibilidade térmica destes que são degradados quando expostos a temperaturas mais elevadas durante um longo período de tempo. O oposto acontece em S3, cujo tratamento térmico promoveu o aumento do teor de fenóis totais em cerca de 41% e 22% quando pasteurizada a 80 e 70 °C, respetivamente. Este aumento, esperado, acontece devido à libertação dos compostos fenólicos existentes no interior dos frutos, uma vez que S3 é constituída por frutos vermelhos, frutos estes conhecidos por terem elevado teor de compostos fenólicos.



**Figura 22** - Variação do teor de fenóis totais e capacidade antioxidante das saladas S1, S2 e S3 submetidas às duas pasteurizações (80 e 70 °C) ao longo dos 56 dias de armazenamento, a 4 e 25 °C.

O efeito do armazenamento no teor de compostos fenólicos totais difere nas três saladas. S1 apresenta estabilidade diferente consoante a pasteurização a que a salada foi sujeita, ou seja, após os 56 dias de armazenamento, a redução do teor de fenóis totais da S1 pasteurizada a 80 °C é de 85% e 37% quando armazenadas a 4 °C e 25 °C, respetivamente, e 8% e 2% na saladas pasteurizada a 70 °C e armazenadas a

4 e 25 °C, respetivamente. S2 apresenta estabilidade semelhante quando pasteurizada a 80 °C, apresentando reduções de 19% e 16%. Na pasteurização a 80 °C e redução de cerca de 44% e 47% na pasteurização a 70 °C, quando armazenada a 4 e 25 °C, respetivamente.

Estudos indicam que os compostos fenólicos existentes nos frutos podem reagir com os polímeros acastanhados originados pela complexação de compostos com os produtos intermediários resultantes da reação de Maillard (101, 123, 124). Tal como verificado pela análise de cor e pela análise sensorial o escurecimento das saladas de fruta está de acordo com a diminuição do teor de compostos fenólicos ao longo do armazenamento (**Figura 12**).

Após o aumento significativo ( $p<0,05$ ) de S3 em T0 devido ao tratamento térmico este apresenta tendência em diminuir ao longo do armazenamento, à exceção da salada pasteurizada a 70 °C e armazenada a 4 °C que sofre um aumento em 40% de T0→T28 ( $p<0,05$ ).

Tal como no teor de compostos fenólicos, a pasteurização resultou na alteração da capacidade antioxidante das saladas relativamente a NP. Em S1, a pasteurização a 80 °C não despoletou alterações na capacidade antioxidante, já o uso de 70 °C promoveu o aumento para o dobro da capacidade antioxidante. Este resultado não vai de encontro com o esperado, uma vez que com a diminuição do teor de compostos fenólicos totais seria de esperar que a atividade antioxidante também diminuísse por falta de disponibilidade destes ao estarem complexados com os polímeros acastanhados. S2 apresenta o efeito esperado, onde a salada tratada a 70 °C não apresenta aumento da capacidade antioxidante enquanto que se sujeita a pasteurização a 80 °C mostram uma perda para metade da capacidade antioxidante. S3 apresenta uma redução da capacidade antioxidante na salada pasteurizada a 70 °C e um aumento na salada pasteurizada a 80 °C. Este último aumento poderá dever-se à libertação dos compostos fenólicos totais cujo aumento em T0 é verificado na **Figura 22**.

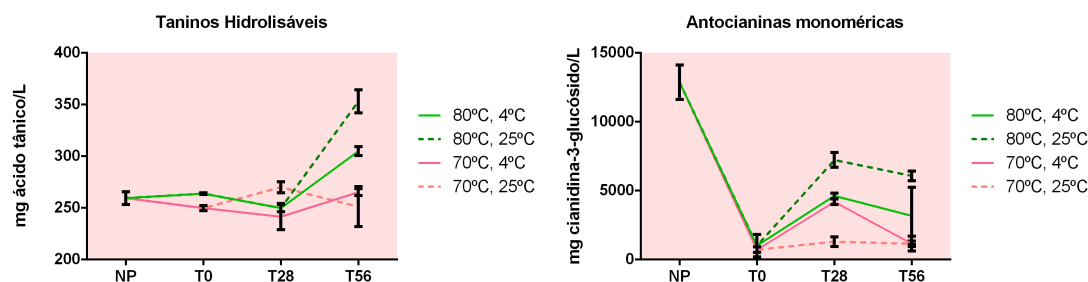
O efeito do armazenamento na atividade antioxidante da S1 tem um comportamento distinto consoante a pasteurização a que a salada foi sujeita, dado que na salada sujeita a 70 °C verifica-se um aumento da atividade antioxidante ao longo do tempo ( $p<0,05$ ). O tratamento a 80 °C mostrou não ter uma tendência na variação da capacidade antioxidante ao longo do armazenamento. Contudo, entre pasteurizações, a temperatura de armazenamento não interfere na capacidade

antioxidante das saladas pois a capacidade antioxidante nos diferentes tempos (NP, T0, T28 e T56) não difere significativamente ( $p>0,05$ ). S2 apresenta uma redução significativa ( $p<0,05$ ) da capacidade antioxidante de T0→ T56 em cerca de 17% e 52% na pasteurização a 70 °C para 4 e 25 °C, que vai de encontro com a diminuição de fenóis totais. S3 apresenta comportamentos absolutamente distintos ao longo do armazenamento consoante a pasteurização a que as saladas forma sujeitas, pelo que a 80 °C sofre um aumento significativo ( $p<0,05$ ) da atividade antioxidante com o tempo, tanto para 4 e 25 °C. No tratamento a 70 °C verifica-se um decréscimo, também significativo ( $p>0,05$ ) da atividade antioxidante, a 4 e 25 °C, ao longo do tempo.

O aumento da atividade antioxidante na S1 pasteurizada a 70 °C e na S3 pasteurizada a 80 °C pode dever-se à formação de melanoidinas, que têm capacidade antioxidante. (125) S1 e S3 contêm na sua constituição frutos ricos em antocianinas e taninos, uva para S1 e morango, mirtilo e framboesa para S3, que são compostos constituídos por 3 anéis benzénicos com grupos hidroxilo e a sua atividade antioxidante se deve à deslocalização eletrónica entre as duplas ligações dos anéis benzénicos e os grupos -OH. Esta deslocalização, e consequente atividade antioxidante, pode ser promovida por co-polimerização destes compostos. De entre estes encontram-se as antocianinas, que existem em elevada quantidade nos frutos vermelhos. Estas são sensíveis ao tratamento térmico podendo ser degradadas e/ou polimerizarem entre si, ou com outros compostos, resultando em compostos de maior peso molecular, nomeadamente os taninos. Assim, foi determinado o teor de antocianinas monoméricas e de taninos hidrolisáveis (**Figura 23**) existentes na S3 de forma a entender se o aumento da atividade antioxidante durante o armazenamento da salada tratada a 80 °C se deveu ao aumento do teor de taninos e antocianinas, já que o teor de fenóis totais diminui ao longo do tempo.

Na **Figura 23** verifica-se que o teor de taninos não é sensível à pasteurização, permanecendo praticamente o mesmo. Contudo este é sensível ao armazenamento, pelo que aumentou significativamente ( $p<0,05$ ) de T28 para T56 nas S3 tratadas a 80 °C e armazenadas a 4 e a 25 °C. Este aumento de cerca de 22% foi mais evidente nas salada armazenada a 25 °C pelo que temperaturas elevadas podem potenciar a polimerização dos compostos fenólicos e consequente formação dos taninos. (25, 27) A pasteurização a 70 °C não promoveu a co-polimerização destes compostos não tendo a temperatura de pasteurização sido suficiente para despoletar a co-

polimerização das antocianinas, tal como verificado no gráfico relativo a estas (Figura 23).



**Figura 23** - Variação do teor de taninos hidrolisáveis e de antocianinas monoméricas ao longo dos 56 dias de armazenamento a 4 e 25 °C nas saladas S3 (salada de frutos vermelhos).

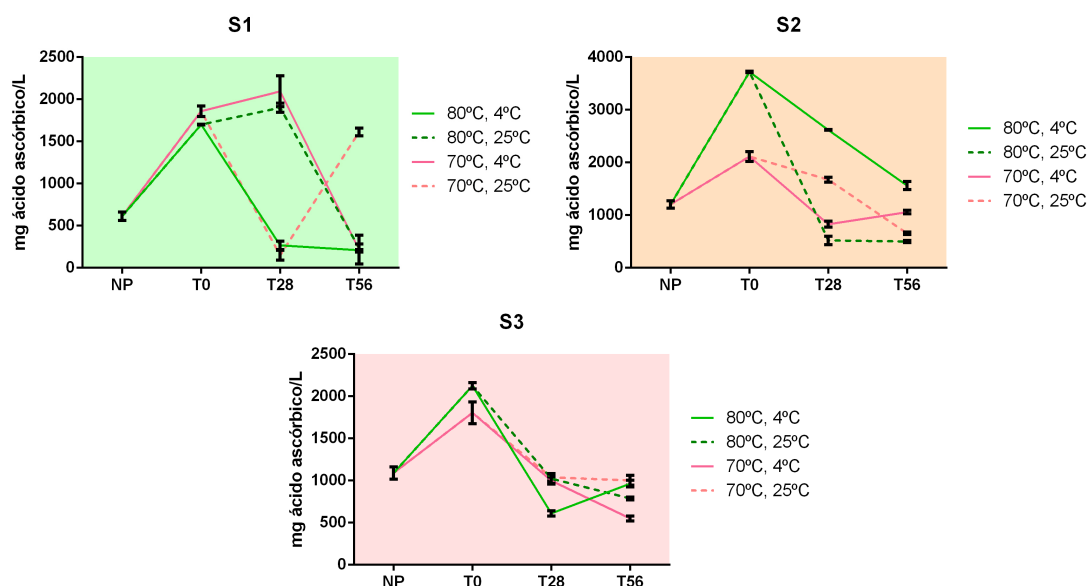
O tratamento térmico, tanto a 80 como a 70 °C, teve efeito drástico no teor de antocianinas levando à brusca diminuição do seu conteúdo na S3. Contudo, o tratamento térmico originou a rutura das paredes celulares dos frutos que com o tempo libertou antocianinas para o meio envolvente (aumento do teor de antocianinas em T28). Esta libertação foi mais evidente na pasteurização a maior temperatura onde o aumento foi significativo ( $p>0,05$ ) de T0→T28 e cerca de 71% e 97% para as saladas armazenadas a 4 e 25 °C, com uma ligeira diminuição ( $p>0,05$ ) em T56 justificável pela reação das antocianinas para a formação dos taninos. No entanto, na salada sujeita a 70 °C a temperatura aplicada não foi suficiente para libertar as antocianinas das paredes celulares e dos vacúolos dos frutos não havendo aumento significativo do teor de antocianinas nestas saladas.

#### 4.1.7 Teor de ácido ascórbico

O ácido ascórbico é um composto que existe normalmente em elevada quantidade nos frutos. Aliado ao seu uso como agente antioxidante nos frutos processados este foi ainda adicionado nos sumos utilizados para a preparação das saladas de fruta como conservante.

Na **Figura 24** está apresentado o conteúdo em ácido ascórbico das saladas após a pasteurização a 70 e 80 °C e armazenamento ao longo de 56 dias a 4 e 25 °C. As saladas frescas (NP) apresentam cerca de 1000 mg/L de ácido ascórbico, o que está de acordo com o teor de ácido ascórbico descrito na bibliografia em saladas de fruta frescas constituídas por kiwis (~800 mg/L), laranja (~600 mg/L) e sumo de laranja (~500 mg/L) (3). Na S2 a pasteurização despoletou um aumento de ácido ascórbico quatro vezes superior nas saladas de fruta sujeitas a tratamento térmico a 80

°C e para o dobro nas saladas sujeitas a 70 °C. Dada a sensibilidade térmica do ácido ascórbico era esperada uma redução do seu teor após a pasteurização, o que não foi verificado em nenhuma das saladas de fruta, havendo por conseguinte um aumento significativo ( $p<0,05$ ) em todas as saladas em ambas as temperaturas de pasteurização, em S1 para 3 vezes o teor inicial em NP e em S3 para o dobro relativamente a NP.



**Figura 24** - Variação do teor de ácido ascórbico das saladas S1, S2 e S3 submetidas às duas pasteurizações (80 e 70 °C) ao longo dos 56 dias de armazenamento, a 4 e 25 °C.

Ao contrário da pasteurização, com o armazenamento houve uma diminuição no conteúdo em ácido ascórbico, que se pode verificar pela diminuição de T0→T28 em todas as saladas de fruta e em ambas pasteurizações e temperaturas de armazenamento à exceção da salada S1 pasteurizada a 80 °C e armazenada a 25 °C. A estabilidade deste composto é afetada por diversos fatores como a presença ou ausência de oxigénio, a temperatura, o pH, a atividade de água e a luz. Uma vez que as saladas são detentoras de uma elevada atividade de água e não foram protegidas da luz durante todo o armazenamento, esta pode ser uma das razões da oxidação não enzimática do ácido ascórbico.

O ácido ascórbico pode também ser degradado por via enzimática pela enzima ascorbato oxidase (AAO). A AAO quando sujeita a 80 °C durante cerca de 10 min é inativada quase por completo. Munyaka *et al* (126) sugerem ainda que para inativar a AAO o tratamento térmico deve ser feito a pelo menos 70 °C de forma a evitar a degradação do ácido ascórbico. (126) Desta forma é possível concluir que a degradação do ácido ascórbico nas saladas de fruta se deveu à degradação não



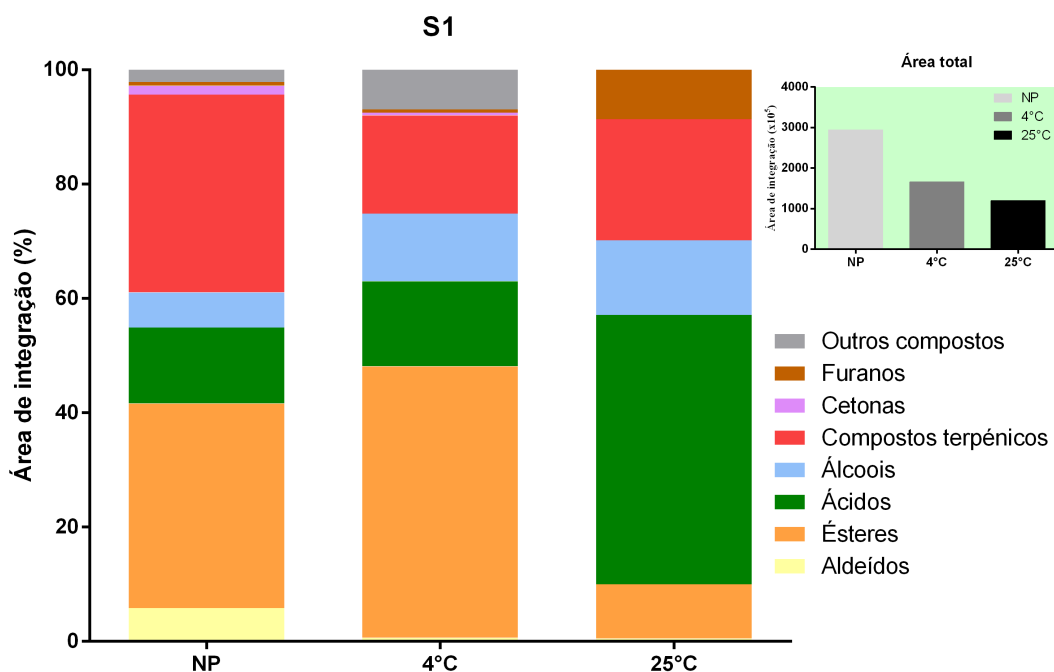
enzimática, que por conseguinte, teve efeito na cor destas. Na presença de oxigénio o ascorbato degrada-se em desidroascorbato (DHAA) que se converte em ácido 2,3-L-dicetogulónico formando compostos intermediários da degradação do ácido ascórbico, como ácidos carboxílicos, cetonas e aldeídos. (3) Estudos relataram a perda de ácido ascórbico em kiwis e sumos de laranja após um longo tempo de armazenamento a baixa temperatura. Embora outros estudos demonstrem que armazenar frutos a temperaturas superiores a 20 °C leva à diminuição do conteúdo de ácido ascórbico (3, 127), no presente estudo o armazenamento a 25 °C não promoveu maior degradação de ácido ascórbico relativamente às saladas armazenadas a 4 °C, à exceção de S2 onde houve uma descida brusca do teor de ácido ascórbico cerca de 7 vezes (T0→T28) nas saladas pasteurizadas a 80 °C e armazenadas a 25 °C. A S2 pasteurizada a 70 °C apresenta maior estabilidade a 25 °C até T28 apresentando maior teor de ácido ascórbico. Contudo de T28→T56, S2 sofre uma redução significativa de ácido ascórbico para cerca de metade relativamente à S2 armazenada a 4 °C (que se mantém estável).

S1 é a salada de fruta que apresenta maiores diferenças, não apresentando tendência aparente entre pasteurizações ou temperaturas de armazenamento relativamente ao teor de ácido ascórbico. Ao longo do armazenamento este sofreu uma redução significativa, de T0→T28 em cerca de 6 vezes na salada pasteurizada a 80 °C e armazenada a 4 °C e cerca de 12 vezes na salada tratada a 70 °C e armazenada a 25 °C. Já a S1 pasteurizada a 80 °C e armazenada a 25 °C e a S1 tratada a 70 °C e armazenada a 4 °C sofreram um aumento de 10% e 67% de T0→T28. No geral, o teor ácido ascórbico ao 56º dia é inferior relativamente a T0 para as três saladas, S1, S2 e S3, pelo que se pode concluir que o armazenamento condiciona a redução do ácido ascórbico nas saladas de fruta, embora não seja verificada nenhuma tendência comum nas 3 saladas de que o armazenamento a temperatura baixa ou elevada tem maior ou menor efeito na estabilidade deste composto. Quanto à temperatura de pasteurização o mesmo sucede pois a diferença de 10 °C parece não influenciar o teor de ácido ascórbico pelo que as saladas de fruta podem ser pasteurizadas a menor temperatura.

#### 4.1.8 Compostos voláteis

A análise da composição volátil foi realizada nas saladas sujeitas à pasteurização a 70 °C e após o segundo mês de armazenamento (T56) a duas temperaturas diferentes (4 e 25 °C), de forma a verificar a influência da pasteurização e do armazenamento na estabilidade dos compostos voláteis. O estudo da composição volátil teve como principal objetivo a pesquisa dos potenciais marcadores responsáveis pelas reações de Maillard que justificassem o escurecimento das saladas de fruta já que as enzimas POD e PPO se encontram inativadas. Porém, para esta pesquisa era necessário obter o cromatograma completo de toda a composição volátil das saladas pelo que se pensou que seria interessante estudar a composição volátil destas e perceber se existiam diferenças entre as saladas já que estas apresentam diferenças na sua composição frutífera. Esta análise foi apenas de carácter qualitativo, pois por escassez de tempo apenas foi efetuada uma réplica da composição volátil das saladas.

Na análise dos compostos voláteis por HS-SPME-GC-MS foram identificados 67 compostos para S1, 32 compostos para S2 e 62 compostos para S3. A temperatura elevada a que as saladas foram pasteurizadas (70 °C) e o tempo e temperatura de armazenamento (56 dias a 4 e 25 °C) originaram a perda de alguns compostos voláteis devido à sensibilidade térmica destes, mas também levou à formação de outros compostos. (128, 129) Nas **Figuras 25, 26 e 27** está apresentada a composição volátil das saladas S1, S2 e S3, respetivamente, não pasteurizadas e pasteurizadas a 70 °C (armazenadas a 4 e 25 °C durante 56 dias).



**Figura 25** - Composição volátil de S1 antes de pasteurizar (NP) e pasteurizada a 70 °C (armazenadas durante 56 dias a 4 e 25 °C).

A partir da **Figura 25** é possível verificar que S1 tem uma composição volátil constituída por diferentes famílias de compostos: cetonas, ésteres, compostos terpénicos, álcoois, ácidos, furanos e aldeídos (**Anexo II**). Na salada fresca (NP) os compostos terpénicos e os ésteres encontram-se numa proporção superior. Uma vez que se tratam de saladas de fruta e, portanto, de uma matriz constituída por diversos frutos, é de esperar que o perfil volátil seja constituído por um conjunto de compostos voláteis característico de diferentes frutos. Na salada de fruta armazenada a 4 °C durante 56 dias foi notável o aumento de ésteres e álcoois e redução dos aldeídos, cetonas e compostos terpénicos. O aumento de ésteres e álcoois está normalmente associado à produção de *off flavors*. Perez-cacho *et al* (8) sugeriram que o aumento de álcoois poderá dever-se à degradação térmica ácidos fenólicos, como os ácidos cinâmicos. (8) Na salada armazenada a 25 °C foi notável o aumento dos ácidos, álcoois e compostos orgânicos e a redução dos compostos terpénicos, aldeídos, cetonas e ésteres. A redução desta última família na salada armazenada a 25 °C relativamente a NP pode ser justificada pelo aumento dos ácidos por conversão dos ésteres em ácidos ao longo do armazenamento. (130) No geral, a redução dos compostos voláteis pode dever-se à sua oxidação ao longo do armazenamento e/ou complexação com compostos de Maillard. O uso de tratamentos térmicos origina *off-*

*flavors* e precursores de reações de Maillard e de Strecker. Quando a salada foi aquecida uma série de reações químicas deram início envolvendo os compostos fenólicos, açúcares, aminoácidos, lípidos, ácido ascórbico e compostos sulfurados. A degradação térmica dos hidratos de carbono resultou no aumento de furanonas e compostos de Maillard e a degradação dos aminoácidos forma aldeídos de Strecker. (8) Isto justifica o aumento visível da família de furanos na salada armazenada a 25 °C (**Figura 25**).

As alterações na composição aromática durante o armazenamento devem-se ao tempo e temperatura, oxigénio existente, exposição à luz e possíveis contaminações existentes. De entre estes a temperatura é o mais importante. Na **Figura 25** é possível verificar claramente que a temperatura de armazenamento tem impacto na composição volátil de S1, pois a salada armazenada a 25 °C apresenta maior percentagem de área relativa aos compostos terpénicos, ácidos e furanos comparativamente com a salada armazenada a 4 °C. Esta em contrapartida apresentam maior área de ésteres. O destacamento da família dos furanos na salada S1 armazenada a 25 °C pode indicar presença compostos acastanhados. As degradações dos compostos existentes nas saladas induzidas pela temperatura produzem ácidos como o acético e o butírico (**Tabela 4**), furanos (furfural e HMF) e furanonas (furanona e 2,5-dimetil-4-metoxi-(2H)furanona). (8) Na **Tabela 4** estão presentes alguns compostos voláteis identificados em S1 por HS-SPME-GC-MS e a associação dos compostos voláteis ao frutos - manga, uva, maçã, melão e sumo de pera. A tabela completa correspondente à composição volátil total da S1 encontra-se no **Anexo II**. Vários compostos apenas foram identificados na salada fresca (NP) deixando de o ser na salada pasteurizadas a 70 °C e armazenada durante 56 dias. Uma vez que não foi analisada a composição voláteis das saladas após a pasteurização, ou seja, em T0, não se pode concluir ao certo o efeito da pasteurização na composição volátil mas sim o efeito desta aliada ao tempo e temperatura de armazenamento. Uma das família afetada pelo processamento foi a dos aldeídos que, à exceção do benzaldeído, não foram detetados na salada de fruta pasteurizada. A presença de benzaldeído, tanto a 4 como a 25 °C, pode ser indicadora de reações de escurecimento podendo a sua formação ter sido potenciada pela temperatura de pasteurização.

A temperatura de armazenamento tem forte impacto na composição volátil pois o armazenamento a 4 °C durante os 56 dias promoveu o aparecimento de alguns

compostos não detetados nas saladas armazenadas a 25 °C. Esta diferença surge maioritariamente nas famílias de ácidos e ésteres, os primeiros predominantes no armazenamento a 25 °C e os segundos a 4 °C. Isto poderá dever-se ao facto da temperatura de armazenamento mais elevada (25 °C) potenciar a hidrólise dos ésteres resultando na conversão em ácidos. O ácido predominante na S1, e que sofre maior aumento na salada a 25 °C é o ácido acético. Este aumento pode ser justificado pelo facto desta salada apresentar contagens microbiológicas até ao 28º dia, já que o aumento do ácido acético está, normalmente, associado ao crescimento microbiano. Contudo, e como é verificável pela análise sensorial, os provadores não demonstraram insatisfação quanto ao sabor da S1 até T56, pelo que a quantidade de ácido acético formada, mesmo possuindo um limite de percepção sensorial baixo, não foi suficiente para ser detetada pelos provadores.

**Tabela 4** – Compostos voláteis presentes nas saladas S1 frescas (NP) e pasteurizadas e armazenadas durante 56 dias a 4 e 25 °C. (31, 32, 131-133)

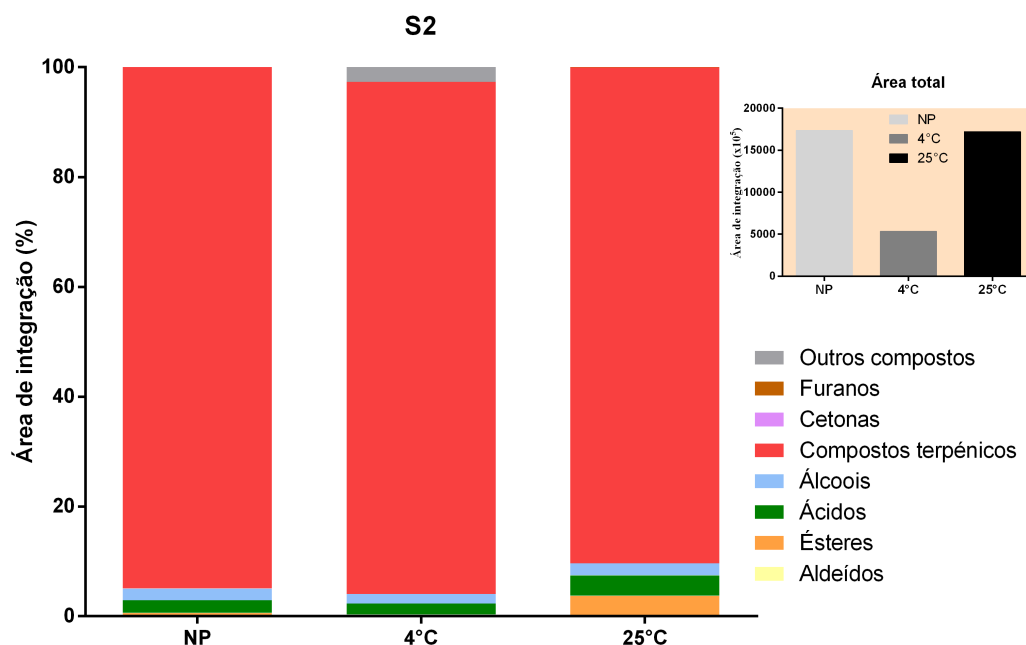
<b>S1</b>					
<b>ALDEÍDOS</b>					
<b>COMPOSTOS</b>	<b>TR</b>	<b>Área de integração (x105)</b>			<b>FRUTOS</b>
		<b>NP</b>	<b>4°C</b>	<b>25°C</b>	
Hexanal	6,28	62,2	nd	nd	Maçã, Melão, Pera (32,36,38,39,131)
Heptanal	18,94	7,4	nd	nd	Maçã, Melão (32,36,39,132)
Nonanal	23,8	5,5	nd	nd	Melão, Pera (38,39,131,132)
Nonenal	31,7	31,6	nd	nd	Manga (42,133)
2-nonenal	31,83	12,6	nd	nd	Manga (42,133)
Benzaldeído	35,99	nd	9,99	5,8	Maçã, Melão (32,36,39,132)
2,6-nonadienal	34,68	51,3	nd	nd	Manga, Melão (39,42,132,133)
Área total		170,6	9,99	5,8	
<b>ÁCIDOS</b>					
<b>COMPOSTOS</b>	<b>TR</b>	<b>Área de integração (x105)</b>			<b>FRUTOS</b>
		<b>NP</b>	<b>4°C</b>	<b>25°C</b>	
Ácido acético	2,13	126,7	234,2	362,6	Maçã, Manga (32,36,42,133)
Ácido butanoico	9,91	141,1	nd	150,9	Manga (42,133)
Ácido butírico	37,43	5,2	nd	nd	Maçã (32,36)
Área total		273	234,2	513,5	
<b>ÁLCOOIS</b>					
<b>COMPOSTOS</b>	<b>TR</b>	<b>Área de integração (x105)</b>			<b>FRUTOS</b>
		<b>NP</b>	<b>4°C</b>	<b>25°C</b>	
Etanol	2,68	109	88,8	101,2	Melão (39,132)
Butan-1-ol	7,79	30,5	83,7	55,6	Maçã, Uva

2-metil-butan-1-ol	16,14	nd	21,2	nd	(32,36,43) Maçã, Uva (32,36,43)
Benzilálcool	47,57	nd	0,5	nd	Uva, Maçã, Melão (32,36,39,43,133)
Área total		139,5	194,2	156,8	
COMPOSTOS TERPÊNICOS					
COMPOSTOS	TR	Área de integração (x105)			FRUTOS
		NP	4°C	25°C	
$\alpha$ -pineno	4,8	10	nd	nd	Manga (42,133)
$\delta$ -3-carene	8,21	712,2	258,6	253,9	Maçã, Uva
$\alpha$ -felandreno	8,42	54,8	nd	nd	Manga (32,36,42,43,133)
Limoneno	10,71	22	nd	nd	Maçã, Melão, Pera (32,36,38,39,131)
$\alpha$ -terpinoleno	15,73	23	6,7	nd	Manga (42,133)
$\alpha$ -farneseno	43,73	129,5	20	nd	Maçã (32,36)
Área total		951,5	285,3	253,9	
ÉSTERES					
COMPOSTOS	TR	Área de integração (x105)			FRUTOS
		NP	4°C	25°C	
Butilacetato	6,01	238,5	109,1	113,6	Pera, Maçã (32,36,38,131)
Butanoato de etilo	4,78	328,5	241,2	nd	Manga, Melão, Pera (42,133)
Etil-2-metilbutirato	5,23	10,5	nd	nd	Maçã (32,36)
n-Hexilacetato	16,09	174,8	29	nd	Maçã, Pera (32,36,38,131)
3-hexenilacetato	18,8	5	nd	nd	Maçã (32,36)
Butirato de Hexilo	24,8	12,8	nd	nd	Maçã (32,36)
3-Hexenilisobutirato	31,83	nd	14,8	nd	Maçã (32,36)
3-Hexenil-2-butanoato	39,21	nd	33	nd	Maçã (32,36)
Butirato de Metilo	3,51	11,3	nd	nd	Manga (42,133)
Acetato de 2-Metilbutilo	10,81	nd	16,4	nd	Maçã (32,36)
Metil-2-metilbutanoato	6,11	nd	32,4	nd	Melão, Maçã (32,36,39,132)
Octilformato	33,62	5,6	3,6	nd	Uva (32,43)
Área total		787	495,9	113,6	
CETONAS					
COMPOSTOS	TR	Área de integração (x105)			FRUTOS
		NP	4°C	25°C	
Dimetoxiciclopropano	10,14	nd	8,1	nd	Melão (39,132)
Acetoina	16,96	3,6	nd	nd	Maçã (32,36)
6-Metil-5-hepten-2-ona	20	21,9	nd	nd	Maçã, Pera (32,36,38,131)
Furanona	53,32	nd	4,2	nd	Manga (42,133)
Área total		25,5	12,3	0	

TR – tempo de retenção; nd – não detetados

Os compostos terpénicos demonstraram ser sensíveis ao tratamento térmico pois o  $\alpha$ -pineno, o  $\alpha$ -felandreno, o limoneno, o sabineno, o cariofileno, o metieugenol, o miristato de etilo, o eugenol e a carvona deixaram de ser detetados na salada pasteurizada. Esta redução está de acordo com o descrito na bibliografia sugerindo que os compostos terpénicos são termolábeis. (130) Na salada armazenada a 25 °C o  $\delta$ -3-careno foi o único composto terpénico identificado, tendo sofrido uma redução da área em cerca de 3 vezes nas saladas armazenadas a 4 e 25 °C.

A S2 apresenta uma composição volátil muito diferente de S1, sendo constituída em mais de 90% por compostos terpénicos como é possível verificar na **Figura 26** e na **Tabela 5** tanto nas NP como nas saladas pasteurizadas e armazenadas 56 dias a 4 e 25 °C., assim como no **Anexo III** As restantes famílias de compostos voláteis encontram-se em quantidades muito reduzidas, contudo é possível verificar a existência de outros compostos como o benzeno e ciclohexeno, (**Anexo III**) na salada armazenada a 4°C e de ésteres na salada armazenada a 25 °C. Sendo esta salada composta maioritariamente por laranja e sumos de laranja seria de esperar que esta apresentasse uma composição volátil similar à dos sumos de laranja pasteurizados. Tal não é verificado pois Perez-cacho *et al* (8) associam o aroma fresco do sumo de laranja primariamente a aldeídos e ésteres com adição a uma menor quantidade de álcoois cetonas e terpenos (mireceno, pineno e limoneno).



**Figura 26** - Composição volátil de S2 antes de pasteurizar (NP), pasteurizadas a 70°C e armazenadas durante 56 dias a 4 e 25 °C. Análise qualitativa dos compostos voláteis efetuada por HS-SPME-GC-MS (uma réplica).

Para a família de compostos terpénicos não é possível estabelecer uma estabilidade global dos diferentes compostos que a constituem relativamente às temperaturas de armazenamento. Alguns compostos como o  $\alpha$ -pineno e o  $\beta$ -mirceno sofrem um decréscimo a 4 °C relativo a NP, enquanto outros -  $\delta$ -3-careno,  $\alpha$ , $\beta$ -felandreno - deixam se ser detetados. O mesmo se sucede na salada armazenada a 25 °C que apresenta compostos voláteis que não tinham sido detetados em NP, demonstrando que o processamento e armazenamento a 25 °C promove a formação de compostos voláteis.

O limoneno é o composto terpénico com maior área de na salada fresca, reduzindo em cerca de 4 vezes na salada armazenada a 4 °C e 10% a 25 °C devido à sua termolabilidade. (130)

**Tabela 5** - Compostos voláteis correspondentes às saladas S2 frescas (NP) e pasteurizadas e armazenadas durante 56 dias a 4 e 25 °C.

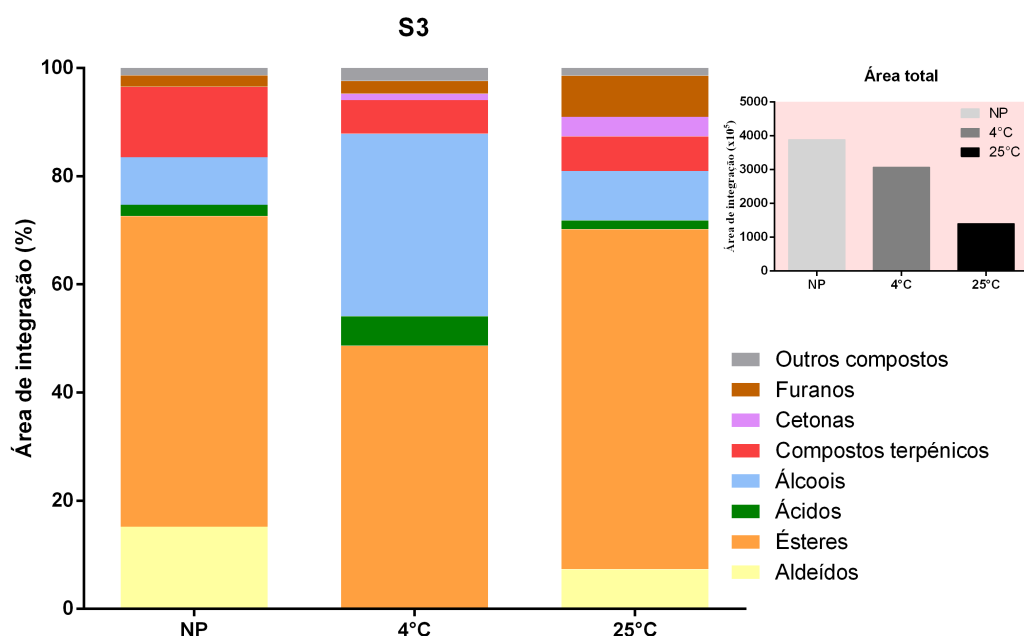
S2					
ÁCIDOS					
COMPOSTOS	TR	Área de integração (x105)			FRUTOS
		NP	4°C	25°C	
Ácido acético	3,05	272,8	92	285,9	Manga (42,133)
Ácido butanoico	5,52	34,4	15,4	285,9	Manga (42,133)
Área total		307,2	107,4	571,8	
COMPOSTOS TERPÉNICOS					
COMPOSTOS	TR	Área de integração (x105)			FRUTOS
		NP	4°C	25°C	
$\alpha$ -pineno	9,52	74,1	35,1	n.d	Manga (42,133)
$\beta$ -pineno	12,33	n.d	n.d	210,3	Manga (42,133)
$\delta$ -3-carene	11,3	440,2	n.d	418,8	Manga, Laranja (31,41,42,133)
$\delta$ -3-carene	37,03	208,9	64,8	282,3	Manga, Laranja (31,41,42,133)
$\alpha$ -felandreno	14,87	90,5	n.d	n.d	Manga (42,133)
$\beta$ -felandreno	42,56	81,4	n.d	409,2	Manga (42,133)
$\beta$ -mirceno	12,55	391,7	50,5	n.d	Manga (42,133)
Limoneno	14,27	14937,8	4545,7	13554,2	Laranja (31,41,42,133)
$\alpha$ -terpinoleno	19,22	39	n.d	48,2	Manga (42,133)
$\gamma$ -terpineno	39,06	57,1	66,3	196,7	Manga (42,133)
Área total		16320,7	4762,4	15119,7	
ÉSTERES					
COMPOSTOS	TR	Área de integração (x105)			FRUTOS
		NP	4°C	25°C	



Butanato de etilo	7,24	n.d	n.d	304,2	Kiwi, Manga (31,42,133)
Área total		0	0	304,2	

TR – tempo de retenção; nd – não detetados

A **Figura 27** apresenta as famílias de compostos voláteis predominantes na salada S3, relativamente às saladas frescas (NP) e armazenadas 56 dias a 4 e 25 °C após pasteurização a 70 °C. A S3 fresca (NP) é constituída maioritariamente por ésteres, seguida de aldeídos e compostos terpénicos (**Anexo IV**). Também tem presente álcoois e ácidos. Os ésteres continuam a ser a família predominante tanto a 4 como a 25 °C.



**Figura 27** - Composição volátil de S3 antes de pasteurizar (NP), pasteurizadas a 70 °C e armazenadas durante 56 dias a 4 e 25 °C. Análise qualitativa dos compostos voláteis efetuada por HS-SPME-GC-MS (uma réplica).

Na salada armazenadas a 4 °C há um aumento dos álcoois e ácidos, que indicam aumento dos *off-flavors*, e a redução de aldeídos e compostos terpénicos. Este aumento de álcoois é comprovado na **Tabela 6** onde é possível verificar a presença de álcoois na salada armazenada a 4 °C que não tinham sido detetados nas saladas frescas (NP) como o hexan-1-ol, 2-hexen-1-ol, 3-hexen-1-ol, octanol e benzenometanol. O álcool benzílico também foi detetado na salada armazenada a 4°C. Voon et al. (130) também identificou o aparecimento do álcool benzílico em dúrios (*Durio zibethinus*) após um mês de armazenamento a 4 °C. O mesmo se

sucedeu em S1 onde o álcool benzílico foi detetado nas saladas armazenadas a 4 °C durante 56 dias.

A salada S3 armazenada a 4 °C apresenta um aumento da família dos ácidos relativo a NP justificável pela conversão de ésteres a ácidos. Na **Tabela 6** estão presentes alguns dos compostos voláteis identificados em S3 por HS-SPME-GC-MS e a correspondência aos frutos que nela estão presentes - morango, framboesa, maçã, mirtilo e sumo de maçã. A composição volátil total está presente no **Anexo IV**. Os compostos voláteis existentes na S3 são mais resistentes à temperatura comparativamente com os da S1 pois o a salada pasteurizada e armazenada a 4 °C e 25 °C não apresentam tantas diferenças na composição volátil relativamente à salada fresca (NP) como na S1.

Tal como em S1, S3 apresenta um aumento no destacamento dos furanos na salada armazenada a 25 °C, embora esta família já fosse verificável em NP e a 4 °C. O aumento da percentagem de área desta família sugere igualmente a existência de reações de acastanhamento na S3.

**Tabela 6** - Compostos voláteis correspondentes às saladas S1 frescas (NP) e pasteurizadas e armazenadas durante 56 dias a 4 e 25 °C. (31, 32, 131-133)

<b>S3</b>					
<b>ALDEÍDOS</b>					
<b>COMPOSTOS</b>	<b>TR</b>	<b>Área de integração (x105)</b>			<b>FRUTOS</b>
		<b>NP</b>	<b>4°C</b>	<b>25°C</b>	
Caproaldeido	9,05	278,8	nd	21,1	Framboesa (31,40)
2-Hexenal	16,46	136,1	nd	nd	Framboesa (31,40)
Heptanal	23,18	56,5	nd	41,7	Maçã (32,36)
Benzaldeido	37,03	118,6	3,5	40,1	Framboesa (31,40)
<b>Área total</b>		<b>590</b>	<b>3,5</b>	<b>102,9</b>	
<b>ÁCIDOS</b>					
<b>COMPOSTOS</b>	<b>TR</b>	<b>Área de integração (x105)</b>			<b>FRUTOS</b>
		<b>NP</b>	<b>4°C</b>	<b>25°C</b>	
Ácido acético	3,48	83,6	49	9	Framboesa (31,40)
<b>Área total</b>		<b>83,6</b>	<b>49</b>	<b>9</b>	
<b>ÁLCOOIS</b>					
<b>COMPOSTOS</b>	<b>TR</b>	<b>Área de integração (x105)</b>			<b>FRUTOS</b>
		<b>NP</b>	<b>4°C</b>	<b>25°C</b>	
Butan-1-ol	10,85	246,6	66,2	49,7	Maçã (32,36)

Hexan-1-ol	9,1	nd	60,2	nd	Maçã e Framboesa (32,36,40)
2-Hexen-1-ol	28,63	nd	20,3	nd	Maçã (32,36)
3-Hexen-1-ol	25,35	nd	673,6	nd	Maçã (32,36)
Octanol	37,06	nd	90	nd	Maçã (32,36)
Álcool benzílico	47,36	nd	nd	0,6	Maçã e Framboesa (32,36,40)
6-Metil-5-hepten-2-ol	32,17	27,4	nd	nd	Maçã (32,36)
2-Metil-butan-1-ol	16,19	nd	44	78	Maçã (32,36)
Heptan-2-ol	23,2	nd	67,5	nd	Framboesa (32,36,40)
<b>Área total</b>		<b>274</b>	<b>1021,8</b>	<b>128,3</b>	
<b>TERPENOS</b>					
<b>COMPOSTOS</b>	<b>TR</b>	<b>Área de integração (x105)</b>			<b>FRUTOS</b>
		<b>NP</b>	<b>4°C</b>	<b>25°C</b>	
Limoneno	14,16	153,6	10,7	7,4	
δ-3-carene	37,03	118,6	53,6	40,1	
γ-terpineno	41,85	nd	2,8	nd	Framboesa (31,40)
α-farneseno	44,03	22,6	3,9	nd	Maçã (32,36)
α-ionona	46,75	99,7	65,7	nd	Framboesa (31,40)
β-ionona	48,86	97,2	54,3	40,6	Framboesa (31,40)
<b>Área total</b>		<b>491,7</b>	<b>191</b>	<b>88,1</b>	
<b>ÉSTERES</b>					
<b>COMPOSTOS</b>	<b>TR</b>	<b>Área de integração (x105)</b>			<b>FRUTOS</b>
		<b>NP</b>	<b>4°C</b>	<b>25°C</b>	
Butirato de etilo	7,2	67,9	nd	26,9	Maçã (32,36)
Acetato de butilo	8,71	435,6	500,3	264,4	Mirtilo (31)
Acetato de 2-Metilbutilo	10,91	nd	341	nd	Maçã (32,36)
Acetato de Amilo	13,69	47,5	55,5	6,8	Maçã (32,36)
Butirato de butilo	16,4	nd	7	nd	Maçã (32,36)
Butirato de Butil-2-metilo	17,16	nd	7,4	nd	Mirtilo (31)
Acetato de n-Hexilo	19,86	632,8	424,8	63	Maçã (32,36)
Butirato de Hexilo	29,52	31,3	nd	nd	Maçã (32,36)
<b>Área total</b>		<b>1215,1</b>	<b>1336</b>	<b>361,1</b>	
<b>CETONAS</b>					
<b>COMPOSTOS</b>	<b>TR</b>	<b>Área de integração (x105)</b>			<b>FRUTOS</b>
		<b>NP</b>	<b>4°C</b>	<b>25°C</b>	
6-metil-5-hepten-2-ona	24,06	nd	15,6	nd	Maçã (32,36)
Acetofenona	41,06	nd	nd	5,8	Framboesa (31,40)
<b>Área total</b>		<b>0</b>	<b>15,6</b>	<b>5,8</b>	

TR – tempo de retenção; nd – não detetado.

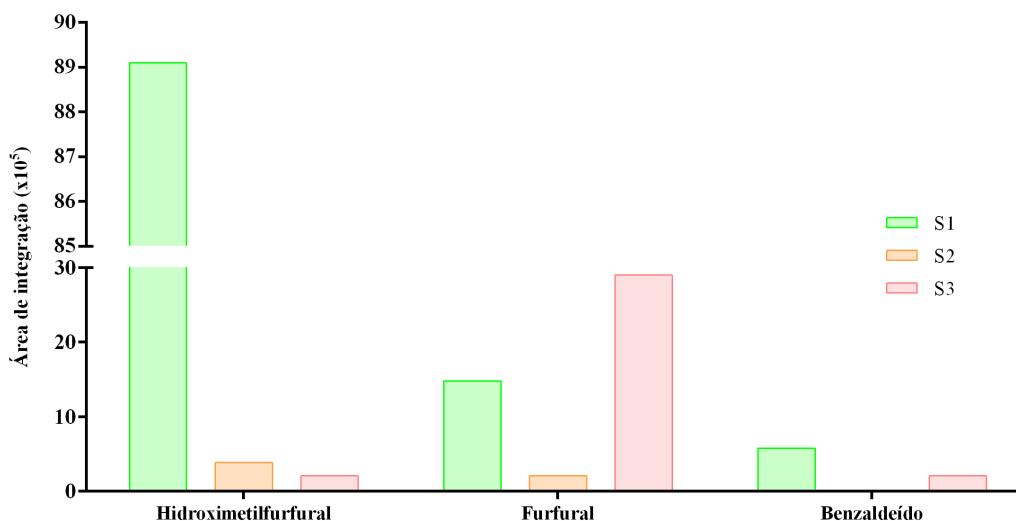
Os compostos terpénicos demonstraram ser estáveis à temperatura tanto de armazenamento como de pasteurização pois o  $\delta$ -3-careno, limoneno e a  $\beta$ -ionona mantiveram-se presentes antes de pasteurizar e o após pasteurizar tanto nas saladas armazenadas 4 como a 25 °C. O  $\alpha$ -farneseno e  $\alpha$ -ionona tiveram uma redução em cerca de 5 vezes e em cerca de metade da área nas saladas armazenadas a 4 °C relativamente às saladas frescas e deixaram de ser detetados a 25 °C.

Os compostos voláteis da S3 são sensíveis à temperatura porém o carácter antioxidante da salada protege-a da oxidação dos compostos tornando-a então, a nível da composição volátil, uma salada mais estável ao tratamento térmico e armazenamento comparativamente com a salada S1, assumindo que a degradação dos compostos voláteis se deve à oxidação destes. S2 é a salada de fruta com menor variedade de compostos voláteis, porém é a detentora de maior teor de compostos terpénicos, compostos estes responsáveis pelo sabor e aroma agradável dos frutos.

#### ***4.1.8.1 Presença de marcadores de reação de Maillard***

A pesquisa por compostos de Maillard foi efetuada apenas nas saladas sujeitas à pasteurização a temperatura mais baixa já que a presença destes compostos nas saladas tratadas a 70 °C demonstra que os mesmos estarão presentes nas saladas tratadas a maior temperatura (80 °C). O tratamento térmico origina o aparecimento de diversos compostos voláteis, de entre eles alguns compostos identificados como marcadores das reações de Maillard. Desta forma a partir da análise de compostos voláteis por HS-SPME-GC-MS foi possível identificar a presença de compostos marcadores das reações de Maillard com diferentes possíveis origens: 1) o 5-hidroximetil-furfural (HMF); 2) o furfural, que resultam da enolização dos açúcares redutores (glucose e frutose) que reagem com aminoácidos após o rearranjo de Amadori e/ou Heynes; e 3) o benzaldeído, que resulta da degradação de strecker que envolve a reação entre aminoácidos que apresentem um grupo amina livre (Lisina, por exemplo) com grupos carbonilo. (134)

Na **Figura 28** estão apresentadas as áreas de integração correspondentes ao 5-hidroximetil-furfural (HMF), ao furfural e ao benzaldeído nas saladas S1, S2 e S3 sujeitas a tratamento térmico a 70 °C e armazenadas a 4 e 25 °C durante 56 dias. A tabela relativa às áreas de integração correspondentes aos compostos de Maillard encontra-se no **Anexo V**.



**Figura 28** - Representação qualitativa da presença de compostos marcadores da reação de Maillard nas saladas S1, S2 e S3 sujeitas a pasteurização a 70°C e armazenadas durante 56 dias a 25°C.

Nas S1 e S3 estão presentes os três marcadores das reações de Maillard, enquanto na S2 apenas foram identificados o HMF e o furfural. A S1 apresenta uma área de HMF cerca de 18 vezes superior às áreas do HMF em S2 e S3. A S3 é a salada com maior área de furfural, seguida da S1 com metade da área e S2 com uma área 10 vezes menor. Assim, avaliando as áreas de integração dos três compostos identificados verifica-se que S1 é a salada que apresenta maior presença destes compostos, podendo estes serem os principais responsáveis pelo seu escurecimento. Relembrando a análise sensorial e a cor, S1 foi uma das saladas apontada como mais instável quanto à cor, já que obteve baixa classificação organolética nesse parâmetro e, a nível da análise por CIELab mostrou ter um escurecimento evidente potenciado pela pasteurização, mas também ao longo do armazenamento.

A reduzida área de integração de HMF e de furfural e a ausência de benzaldeído em S2 sugerem que está ainda se encontra sob efeito protetor dos compostos antioxidantes, como o ácido ascórbico. Outra razão plausível pode ser o baixo teor de açúcares nos frutos que constituem S2 – laranja, kiwi, manga e abacaxi – não havendo substrato suficiente para desencadear as reações de Maillard.

S3 tem presente os três compostos marcadores das reações de escurecimento – HMF, furfural e benzaldeído – sendo que o segundo se encontra em maior área. Isto demonstra que, o escurecimento de S3 não se deveu apenas à degradação das antocianinas devido ao tratamento térmico (135) que resultou na perda da coloração avermelhada e aparecimento da cor castanha, mas também foi potenciado pelas reações de Maillard. Assim, pela análise das área de integração destes compostos,

aliada à análise sensorial e de cor confirma-se que S1 e S3 são as saladas que apresentam maior escurecimento. O pouco escurecimento visualizado em S2 pode dever-se ao pouco HMF e furfural presente na salada.

Nas saladas armazenadas a 4 °C durante 56 dias não foram identificados os compostos de Maillard resultantes do tratamento térmico nas saladas S1 e S2, em S3 o benzaldeído foi detetado mas com uma área pequena ( $\sim 3,5 \times 10^5$ ). As temperaturas de armazenamento baixas não são favoráveis para a formação destes compostos, sendo o armazenamento a 4 °C ideal para evitar o escurecimento das saladas. Esta afirmação está de acordo com a análise sensorial, e com a análise de cor onde as saladas S1 e S2 armazenadas a 4 °C, embora sofram escurecimento ao longo do armazenamento, este não é tão evidente relativamente as saladas armazenadas a 25 °C.

Assim, a pesquisa por marcadores de Maillard veio, desta forma, confirmar que o escurecimento das saladas ao longo do armazenamento se deveu ao escurecimento não enzimático, confirmando assim a inativação enzimática da PPO e POD.

## **4.2 Desenvolvimento de um sensor de temperatura para embalagens alimentares**

Os sensores colorimétricos traduzem alterações visuais promovendo mecanismos de deteção simples, rápidos e de fácil aplicação a nível industrial. Nos últimos anos, os cristais fotónicos têm sido explorados tendo em vista a síntese de sensores cromáticos dado que são materiais cuja cor é influenciada por estímulos externos. Na literatura está já descrita a síntese de nanopartículas em formato *core-shell* cujo centro é composto por SiO<sub>2</sub> e o revestimento constituído por TiO<sub>2</sub>, dois materiais inorgânicos usados para síntese de cristais fotónicos. (92, 136) Por outro lado, têm também sido sintetizados filmes em multicamada de TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub>. Assim, a finalidade da síntese de nanopartículas em formato *core-shell* e de filmes em multicamada compostos por TiO<sub>2</sub> intercalado com SiO<sub>2</sub> é obter um cristal fotónico que reflita a cor quando sujeito a um estímulo externo. (83, 85) É necessário que as multicamadas que constituem o filme apresentem espessura suficiente para alterar o trajeto do feixe da luz permitindo o aparecimento de cor promovido pelo efeito da refração da luz. O TiO<sub>2</sub> e SiO<sub>2</sub> são materiais fotónicos utilizados para este efeito devido à sua sensibilidade a outros estímulos externos como a temperatura e a

humidade, mudando a cor das *core-shell* e/ou filme com a temperatura aplicada devido a fenômenos de contração e/ou relaxamento das multicamadas que revestem as nanopartículas e/ou que fazem parte do filme resultando em diferentes efeitos termo-ópticos. (83)

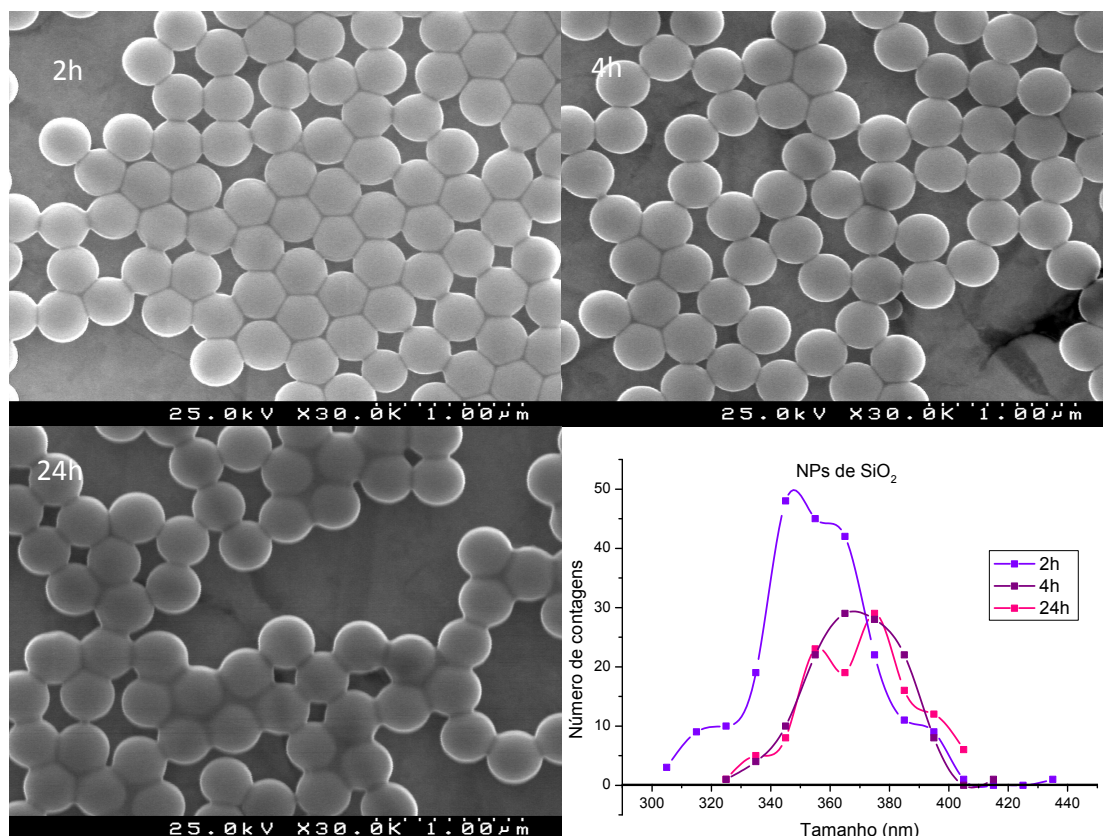
Assim foram realizadas duas abordagens para realização do sensor :

- Desenvolvimento de nanopartículas em formato *core-shell* constituídas por diversas camadas intercaladas de  $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$  para usar como aditivo no polímero do filme que é atualmente usado pela Nutrigreen, S. A. nas embalagens das saladas de fruta. Este polímero é constituído por PET e uma barreira co-estruturada com poliamida/EVOH/PP.

- Desenvolvimento de filmes em multicamada de  $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$  para realização de uma etiqueta resistente a temperaturas de pasteurização de 80 e 70 °C e que se mantenha presa à embalagem. O filme poderá também depositado numa película polimérica da embalagem.

#### **4.2.1 Nanopartículas com formato *core-shell***

As nanopartículas (NPs) em formato *core-shell* foram sintetizadas com  $\text{SiO}_2$  como centro – “*core*” – da estrutura. A **Figura 29** apresenta as imagens de SEM (*scanning electronic microscopy*) das NPs para diferentes tempos de reação (2 h, 4 h e 24 h). A análise visual das imagens parecem indicar que as NPs após 2 h de reação apresentam o mesmo tamanho que as NPs que reagiram durante 4 h e 24 h. A imagem das NPs que reagiram durante 24 h evidencia uma coesão entre partículas vizinhas sugerindo que tempos prolongados de reação promovem a aglomeração e a coalescência das NPs.



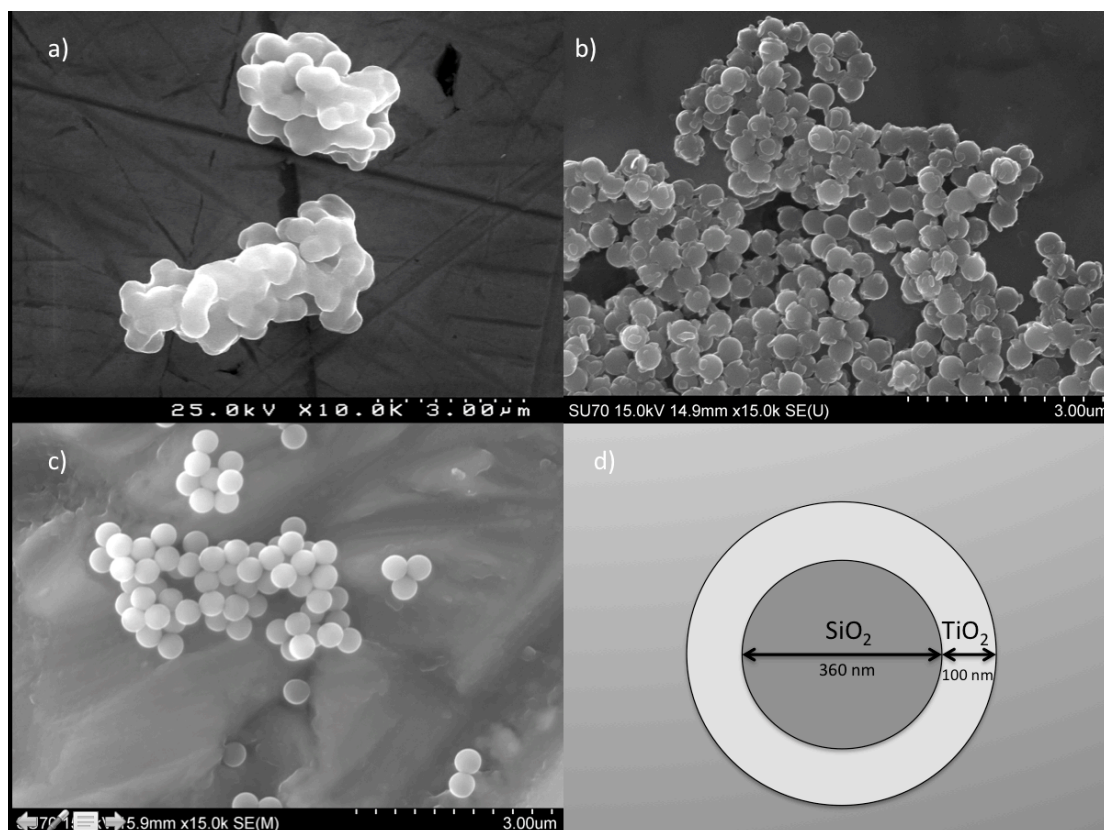
**Figura 29** - NPs de SiO<sub>2</sub> com diferentes tempos de reação (2 h, 4 h e 24 h) e a sua distribuição de tamanhos.

Na **Figura 29** está ainda apresentada a distribuição de tamanho das NPs consoante o tempo de reação. Desta distribuição verifica-se que, de facto, o tempo de reação promove o aumento das NPs pois é possível ver uma deslocação do pico correspondente ao tamanho mais abundante dos 340 nm (para as NPs que reagiram 2 h) para os 360 nm para as NPs que reagiram 4 h. Ao contrário das NPs que reagiram 2 h e 4 h, as que sofreram reação 24 h apresentam uma distribuição bimodal com máximos a cerca de 350 nm e 380 nm. Isto reforça a ideia de que as partículas continuam a reagir com o precursor presente na solução, contribuindo para o crescimento heterogéneo das NPs. Além disso, existe aglomeração de partículas com o tempo pelo que não devem ser excedidas as 4 h de reação para a síntese de partículas de 340 nm.

Após a síntese das NPs de SiO<sub>2</sub> procedeu-se ao revestimento destas com TiO<sub>2</sub>. Para tal usou-se *n*-butóxido de titânio como precursor de TiO<sub>2</sub>, etanol como solvente e uma quantidade reduzida de H<sub>2</sub>O. A reação decorreu sob refluxo de etanol durante 90 min, a 85 °C e sob agitação constante. A microimagem de SEM representativa deste ensaio na **Figura 30a** mostra que as NPs se encontram aglomeradas e apresentam uma capa de TiO<sub>2</sub> em redor do aglomerado destas. Isto poderá dever-se



ao facto das NPs de  $\text{SiO}_2$ , após terem sido lavadas e ressuspendidas em etanol, não terem ficado com resíduos de água. Deste modo, os vestígios de  $\text{H}_2\text{O}$  presentes na suspensão das NPs levaram a que estas ficassem coesas entre si, impedindo o revestimento uniforme do  $\text{TiO}_2$  entre NPs. Além disso, a presença de água é indesejável, já que esta promove a rápida hidrólise do *n*-butóxido de titânio. Esta hidrólise só deve ocorrer quando a solução de NPs e *n*-butóxido de titânio estiver estabilizada, e não numa fase inicial da reação.



**Figura 30** – Micrografias de SEM das diferentes reações de síntese da capa de  $\text{TiO}_2$  em volta das NPs de  $\text{SiO}_2$ . Revestimento efetuado a  $85^\circ\text{C}$  sob refluxo de etanol: a) durante 90 minutos; b) durante 90 minutos com 3 lavagens com etanol e c) durante 24 h usando etanol seco; d) Esquema ilustrativo das NPs *core-shell* pretendidas.

De forma a contornar o sucedido decidi lavar-se previamente 3 vezes em etanol a suspensão das NPs para, por um lado, eliminar a  $\text{H}_2\text{O}$  presente, impedindo a hidrólise precoce do *n*-butóxido de titânio e, por outro, promover a desagregação das NPs. Neste caso, é possível verificar o revestimento individual das NPs, embora a camada formada não seja uniforme (**Figura 30b**). Esta não uniformidade deveu-se, possivelmente, ao excesso de *n*-butóxido de titânio que não reagiu durante a reação, mas que durante as lavagens reagiu com moléculas de água que ainda estariam presentes. Assim, adotou-se o mesmo procedimento, mas prolongando o tempo de reação de 90 minutos para 24 horas (**Figura 30c**). O revestimento formado em torno

das NPs tem um aspeto uniforme, sofrendo um aumento de tamanho de cerca de 40 nm. No entanto, era esperado que da reação resulta-se um revestimento de TiO<sub>2</sub> com cerca de 100 nm conforme ilustrado na **Figura 30d**.

#### 4.2.2 Filmes fotónicos em multicamada de SiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>

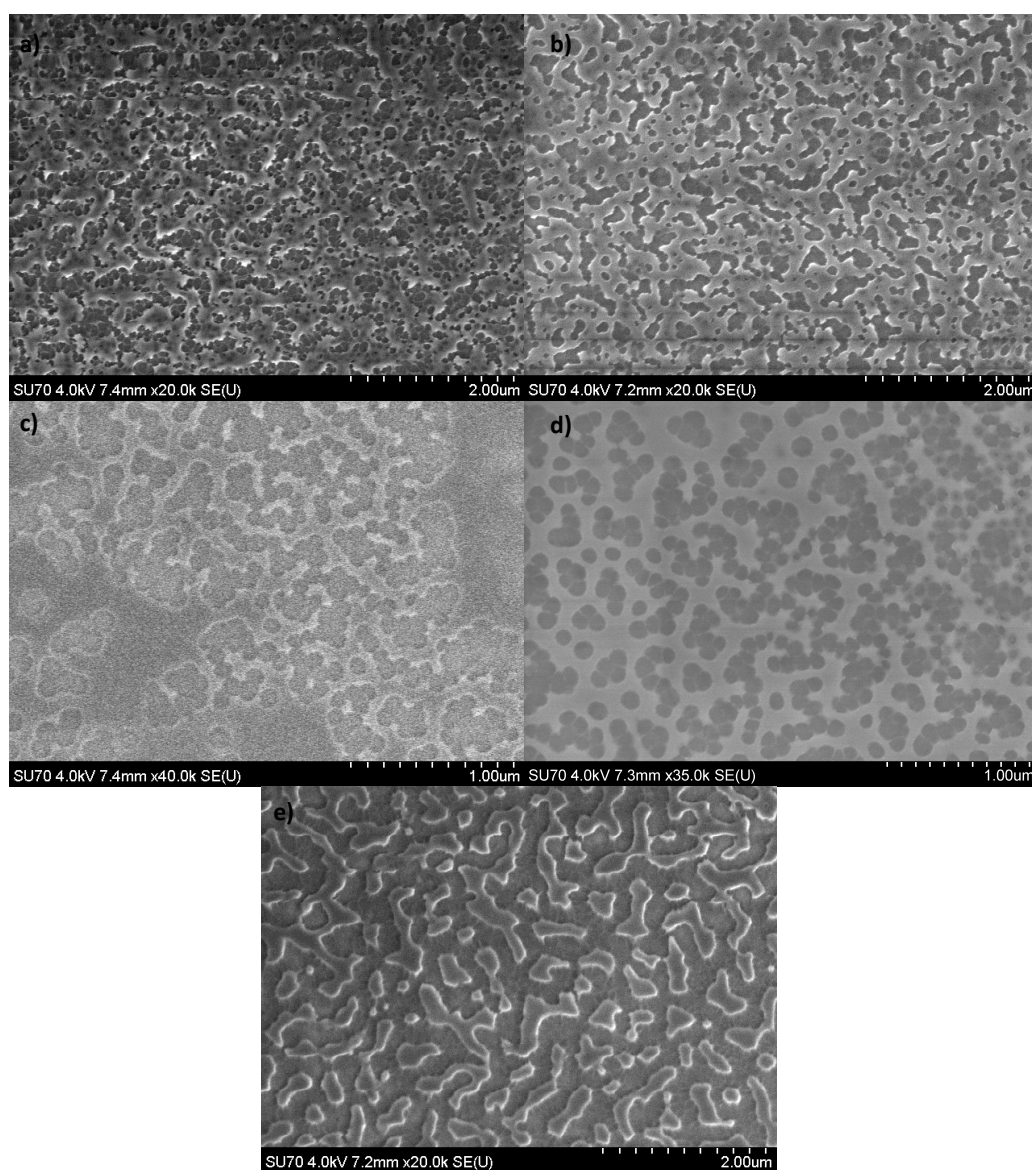
Numa fase inicial, os procedimentos adotados tiveram como finalidade a formação de filmes de TiO<sub>2</sub> poroso. A opção por filmes porosos teve em consideração que o filme formado poderia ser também utilizado como sensor de etileno, através da adsorção desta hormona nos poros. Assim, o filme atuaria como sequestrador de etileno evitando o amadurecimento precoce dos frutos. Os filmes foram sintetizados usando *n*-butóxido de titânio (TiBuO) como precursor de TiO<sub>2</sub>, acetilacetato (ACAC) como estabilizante do *n*-butóxido de titânio, ácido acético como catalisador da reação, etanol como solvente e o polímero PB51-b-PEO62. Os filmes T1, T2 e T3 variaram na proporção de TiBuO, ACAC e ácido acético:

**Tabela 7 – Constituintes dos filmes porosos de TiO<sub>2</sub> e respectivas quantidades utilizadas.**

Filmes	TiBuO	ACAC	CH <sub>3</sub> COOH	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	PB51-b-PEO62
	Massa (g)				
T1	0,42	0,087	0,536	5,522	0,030
T2	0,21	0,044	0,536	5,522	0,030
T3	0,42	0,087	0,268	5,522	0,030

Na **Figura 31** estão apresentadas as microimagens obtidas por SEM correspondentes aos filmes de TiO<sub>2</sub> porosos: T1, T2 e T3. Nas **Figuras 31a e b** encontra-se representado o filme T1 depositado em substrato de vidro usando o método de *dip-coating* com a velocidade de 45 mm.min<sup>-1</sup> e 96 mm.min<sup>-1</sup>, respetivamente. As imagens referidas mostram filmes desorganizados, não sendo perceptível a presença de poros. Os filmes T1 depositados a 96 mm.min<sup>-1</sup> parecem ter uma estrutura mais organizada comparativamente com T1 depositado a 45 mm.min<sup>-1</sup>, apresentando alguma porosidade embora de forma não uniforme. Este resultado parece indicar que a velocidade de deposição influencia a formação dos poros no filme de TiO<sub>2</sub>. Ao analisar as imagens de T1 e ao verificar a desorganização estrutural e não existência de poros pensou-se na possibilidade do excesso de precursores (TiBuO e ACAC) podendo o ácido acético adicionado não ser suficiente para promover a hidrólise completa do TiBuO em TiO<sub>2</sub>. Desta forma, em T2 foi

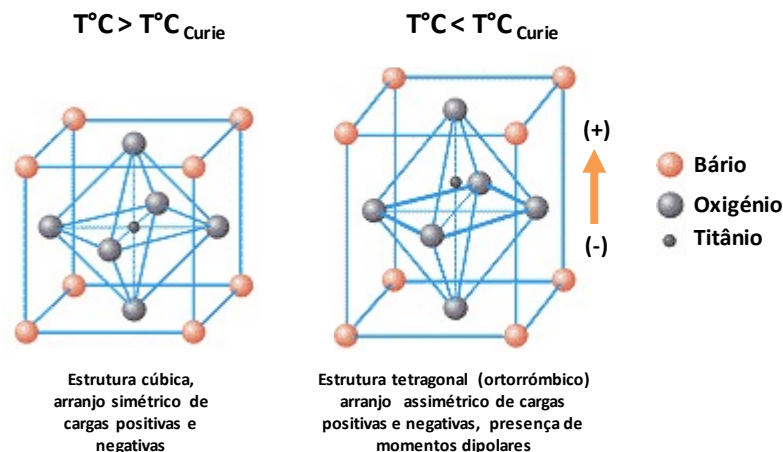
reduzida para metade a quantidade desses precursores. Das microimagens relativas a T2 depositado a  $45 \text{ mm.min}^{-1}$  e  $96 \text{ mm.min}^{-1}$  (**Figuras 31c e d**, respetivamente) os filmes continuam sem apresentar uma estrutura organizada, ainda que seja perceptível a presença de poros na sua constituição, não distribuídos uniformemente por todo o filme e com tamanhos variáveis. O tempo de calcinação pode não ter sido suficiente para retirar os resíduos orgânicos da reação, levando a uma menor presença de poros. Por outro lado, os poros parecem encontrar-se no interior do filme, sendo que o excesso do próprio polímero poderá ter impedido a formação dos poros à superfície. Também neste caso os filmes depositados a  $96 \text{ mm.min}^{-1}$  parecem ter melhor estrutura relativamente aos depositados a  $45 \text{ mm.min}^{-1}$ .



**Figura 31** –Micrografias de SEM dos filmes porosos de  $\text{TiO}_2$ : a) T1 depositado a  $45 \text{ mm.min}^{-1}$ ; b) T1 depositado a  $96 \text{ mm.min}^{-1}$ ; c) T2 depositado a  $45 \text{ mm.min}^{-1}$ ; d) T2 depositado a  $96 \text{ mm.min}^{-1}$  e e) T3 depositado a  $45 \text{ mm.min}^{-1}$ .

A **Figura 31e** apresenta o filme T3 depositado à velocidade de  $45 \text{ mm.min}^{-1}$ . Neste filme foi testada a influência do catalisador na formação do filme de  $\text{TiO}_2$  tendo a quantidade de ácido acético adicionada sido reduzida para metade. Neste caso verificou-se que a redução do catalisador não beneficiou a síntese de filmes de  $\text{TiO}_2$  poroso sendo visível uma estrutura desordenada do filme.

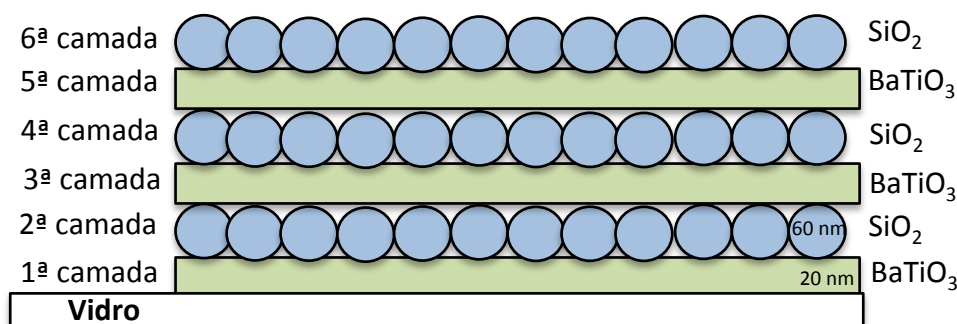
Assim, T2 é o filme de  $\text{TiO}_2$  que apresenta melhores resultados, contudo este ainda não apresenta a porosidade uniforme esperada, necessitando de um processo de otimização das condições reacionais longo. O principal objetivo seria do uso de  $\text{TiO}_2$  poroso seria o de obter um filme em multicamada constituído por dois materiais fotónicos com diferente índice de refração. Assim, decidiu-se proceder à substituição dos filmes porosos de  $\text{TiO}_2$  por filmes porosos de  $\text{BaTiO}_3$  dado que este material também apresenta um índice de refração distinto de  $\text{SiO}_2$  permitindo assim o efeito fotónico esperado. Esta substituição teve em conta que a presença de um elemento piezoelétrico poderia conferir ainda outras vantagens. Quando cristalizado, o titanato de bário ( $\text{BaTiO}_3$ ) pode apresentar propriedades ferroelétricas, ou seja, quando sujeito a um campo elétrico o cristal apresenta polarização espontânea que pode ser orientada pela aplicação de campo. O titanato de bário quando em temperaturas inferiores à temperatura de Curie ( $\sim 120^\circ\text{C}$ , aquela em que ocorre mudança de estrutura cristalina) tem uma estrutura tetragonal e um momento dipolar (**Figura 32**). (137) Os dipolos adjuntos formam regiões com alinhamentos locais chamados de domínios. Estes alinhamentos proporcionam um momento dipolar a todo o domínio e consequentemente a sua polarização. O  $\text{BaTiO}_3$  cristalizado quando exposto a temperaturas acima da temperatura de Curie exibe uma estrutura cúbica centrossimétrica, sem presença de momentos dipolares.



**Figura 32** - Estrutura cristalina do titanato de bário a diferentes temperaturas. (adaptado de (137)).

Tendo em conta que o sensor de temperatura a ser sintetizado terá aplicabilidade para temperaturas de pasteurização inferiores a 120 °C e que as saladas de fruta serão armazenadas a temperaturas também inferiores à  $T_{Curie}$  a propriedade ferroelétrica do bário poderá, posteriormente, ser aproveitada. Contudo é de salientar que a prioridade deste estudo é a síntese de um sensor de temperatura cuja visualização da cor seja possível pela conjugação de dois materiais inorgânicos com diferentes índices de refração que, promovam com a incidência da luz, um efeito fotônico com resposta visual distinta consoante a temperatura a que o sensor é aplicado. (83) Desta forma, a obtenção de um material ferroelétrico não foi considerado prioritário, embora se saliente a possível aplicabilidade deste material baseada nas propriedades ferroelétricas do  $BaTiO_3$ .

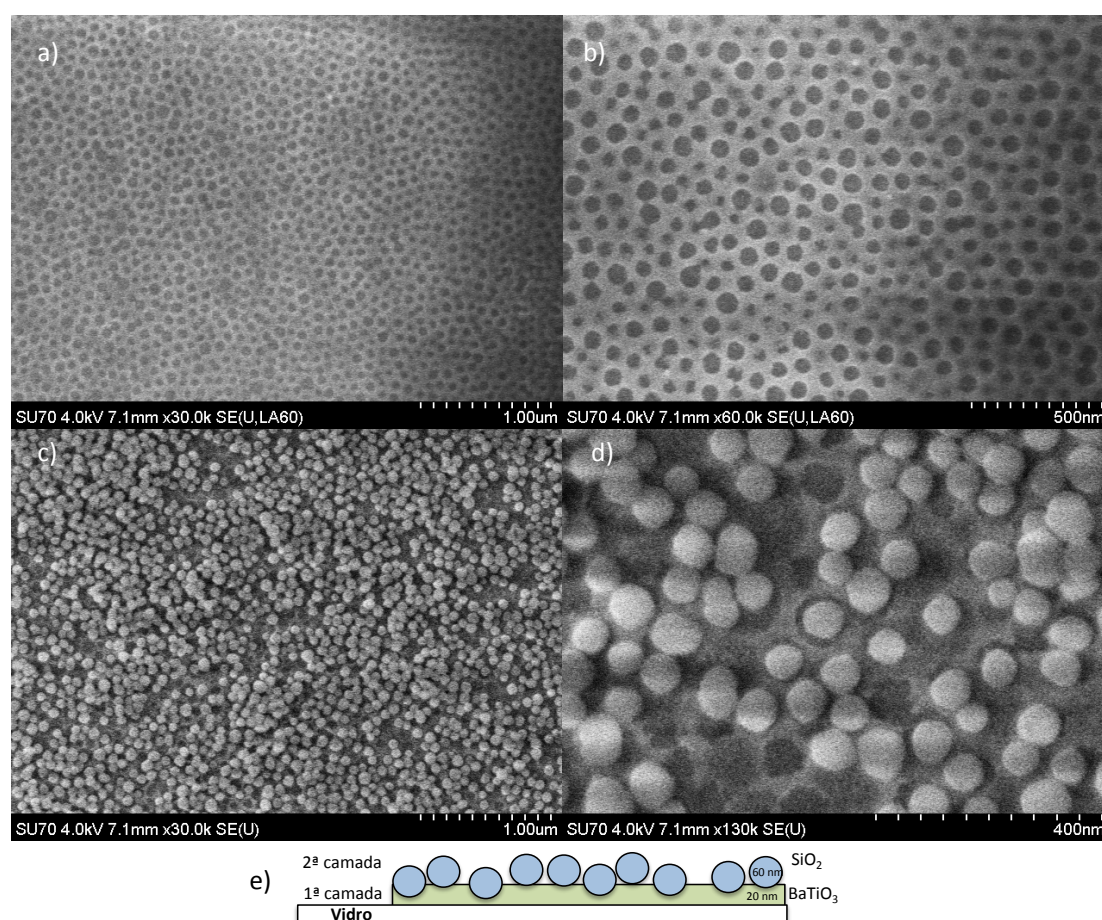
A **Figura 33** representa esquematicamente o filme de  $BaTiO_3/SiO_2$  esperado. O filme é composto por uma camada de  $BaTiO_3$  com ~20 nm seguido de uma camada de NPs de  $SiO_2$  com ~60 nm e assim sucessivamente até se obter a alteração da cor.



**Figura 33** - Representação esquemática esperada do filme em multicamada de  $BaTiO_3/SiO_2$ .



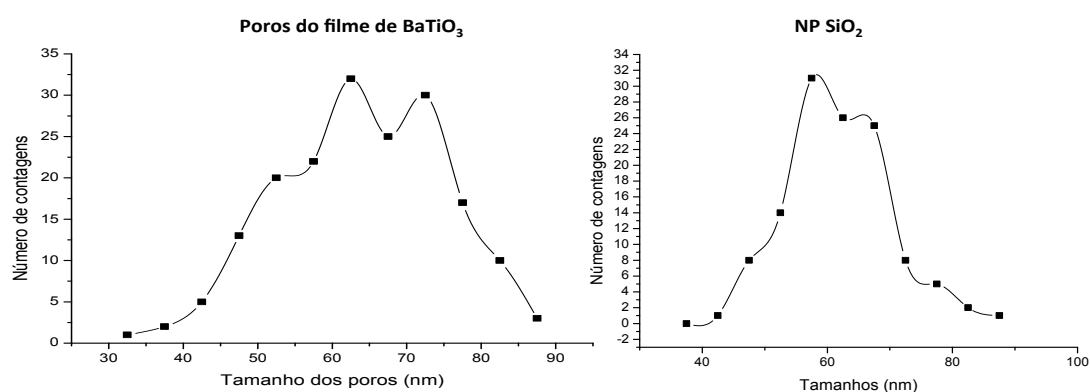
Na **Figura 34** apresentam-se, no topo, as imagens correspondentes ao filme poroso de  $\text{BaTiO}_3$ . Comparativamente com os filmes de  $\text{TiO}_2$  apresentados anteriormente este encontra-se ordenado e com os poros visíveis e fechados. No entanto, estes não são uniformes variando o tamanho entre os 30–90 nm (**Figura 35**). Tal como para o caso das NPs em formato *core-shell*, o dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) foi o material inorgânico escolhido para formar filmes em multicamada com o  $\text{BaTiO}_3$ . Após a deposição do filme de  $\text{BaTiO}_3$  poroso, procedeu-se à deposição da 2ª camada constituída por NPs de  $\text{SiO}_2$  com cerca de 60 nm de diâmetro (**Figura 34**, abaixo).



**Figura 34** – Microimagens de SEM dos filmes porosos de titanato de bário ( $\text{BaTiO}_3$ ) (a e b), seguida de deposição de NPs de  $\text{SiO}_2$  com cerca de 60 nm de diâmetro (c e d). e) Representação esquemática do filme de  $\text{BaTiO}_3/\text{SiO}_2$  obtido.

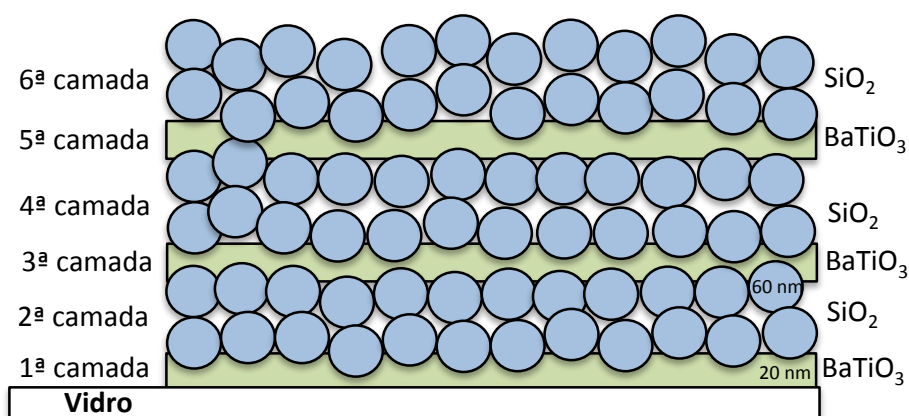
Como verificado acima, algumas NPs entraram nos poros do filme de  $\text{BaTiO}_3$  impedindo a deposição uniforme destas por cima do filme pelo que esta foi insuficiente para cobrir na totalidade o filme de  $\text{BaTiO}_3$ . Isto resulta numa camada sem a espessura suficiente que permita alterar o trajeto do feixe ao atravessar os dois materiais fotónicos e modificar a cor. A distribuição de tamanhos tanto dos poros do

filme de BaTiO<sub>3</sub> como das NPs de SiO<sub>2</sub> está presente na **Figura 35**. O tamanho dos poros está compreendido entre 30 e 90 nm apresentando dois máximos a 60 e 70 nm. As NPs também apresentam uma distribuição de tamanhos com dois máximos rondando os 60 nm, o que explica o facto das NPs entrarem nos poros do filme de BaTiO<sub>3</sub> já que a maioria dos poros apresenta tamanho superior às NPs.



**Figura 35** - Distribuição de tamanhos dos poros existentes nos filmes de BaTiO<sub>3</sub> e das NPs de SiO<sub>2</sub> com cerca de 60 nm de diâmetro.

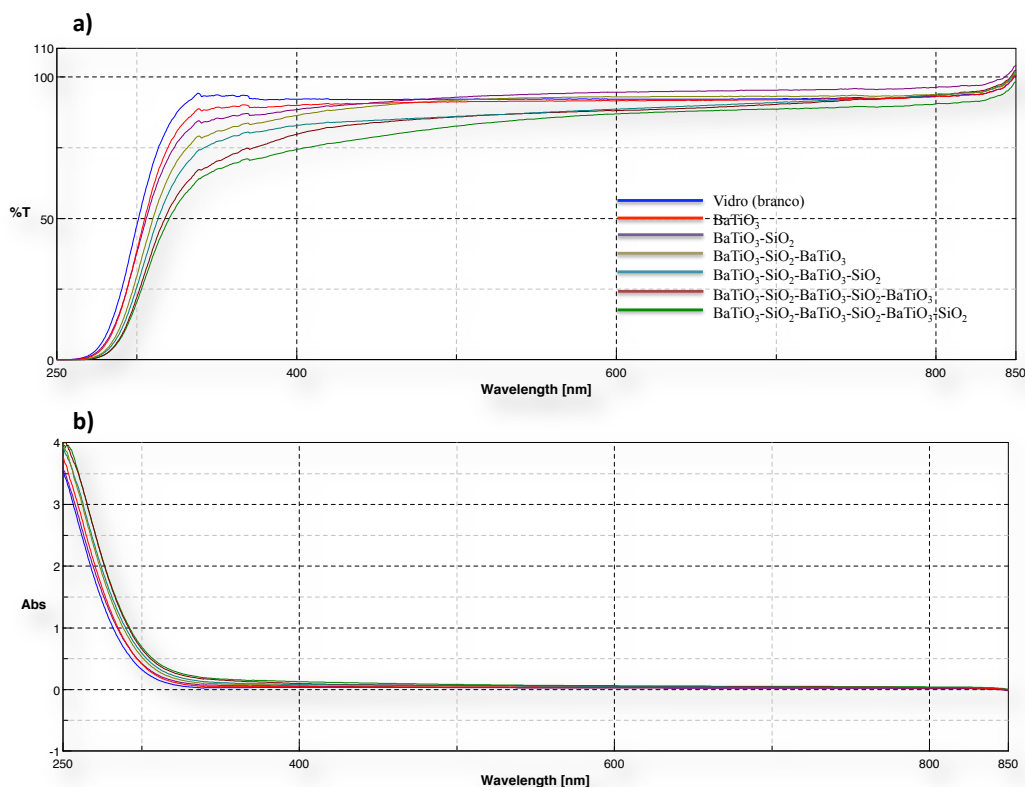
Tal como verificado na **Figura 34**, as NPs depositadas não foram suficientes para cobrir na totalidade o filme de BaTiO<sub>3</sub>, pelo que se decidiu proceder à deposição de duas camadas de SiO<sub>2</sub> (**Figura 36**) entre camadas de BaTiO<sub>3</sub> para tentar garantir que as NP cobrissem na totalidade o filme anteriormente depositado formando uma camada uniforme.



**Figura 36** - Representação esquemática da constituição do filme em multicamada constituído por camadas de BaTiO<sub>3</sub> intercalado com duas deposições de NPs de SiO<sub>2</sub>.

As NPs de 60 nm, mesmo que duas vezes depositadas não são suficientes para o efeito esperado, assim como o filme de BaTiO<sub>3</sub> sintetizado. Isso foi observado a

partir do espectro de transmitância presente na **Figura 37** em que a transmitância do filme diminui com o aumento do número de camadas.

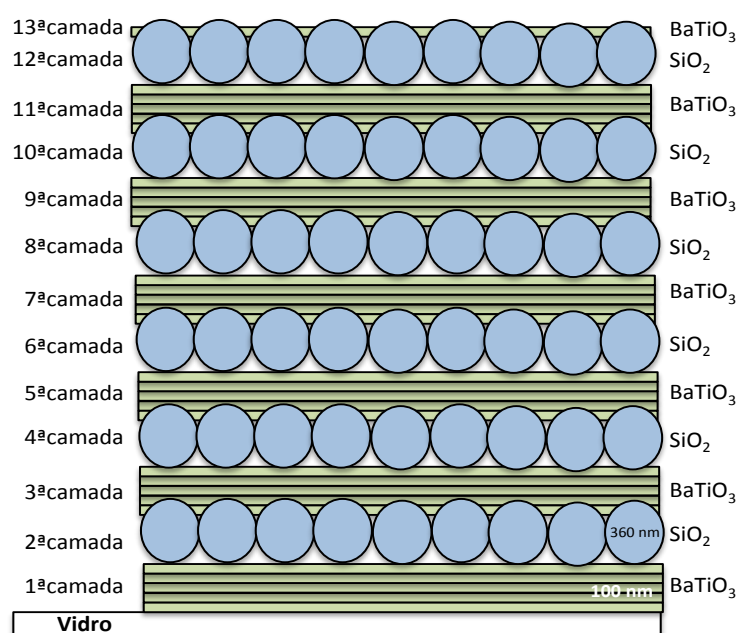


**Figura 37** - Espectro de transmitância (a) e absorvância (b) de BaTiO<sub>3</sub> (~20 nm) e SiO<sub>2</sub> (60 nm, com duas deposições).

Os filmes analisados (**Figura 37**) eram constituídos por camadas intercaladas de BaTiO<sub>3</sub> (~20 nm) e SiO<sub>2</sub> (duas deposições de NPs de 60 nm), tendo o filme um total de 6 camadas. É possível observar que os espectros das diferentes camadas não estão de acordo com os espectros característicos do material depositado, ou seja, do BaTiO<sub>3</sub> ou do SiO<sub>2</sub>, apresentando o mesmo comportamento do vidro. É assim possível confirmar que houve deposição de material no substrato porque a % de transmitância diminui com o aumento das camadas mas, como referido anteriormente, a camada de BaTiO<sub>3</sub> e de SiO<sub>2</sub> não apresentam espessura suficiente para promover a alteração da direção do feixe da luz e consequente aparecimento de cor. Os filmes não apresentam qualquer banda de absorção na zona do visível (400 – 800 nm) contudo a absorvância aumenta com o aumento do número de camadas. Isto sugere que houve adesão e agrupamento do material depositado, ou seja, mesmo não havendo individualização dos diferentes materiais formando camadas distintas, estes estão a interagir e há aderência dos diferentes materiais entre si. (138)

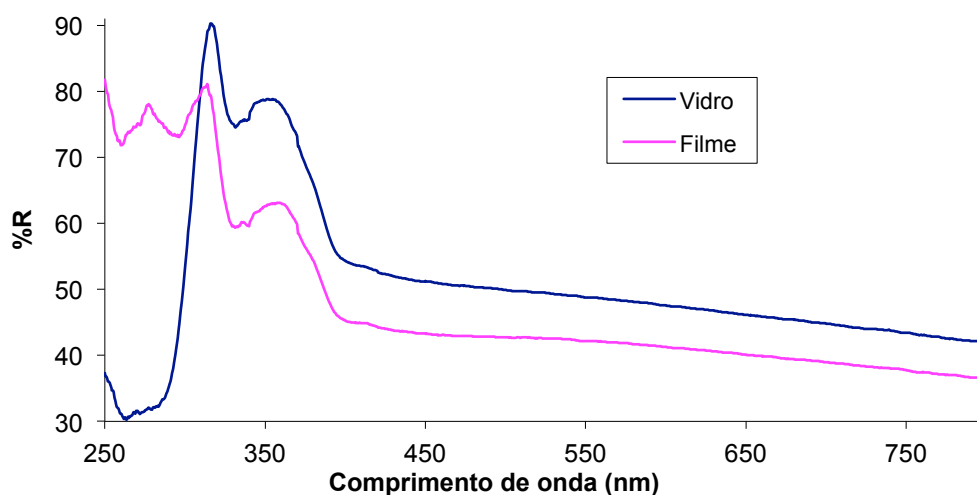


Para além do problema associado ao uso de NPs de cerca de 60 nm, o uso de filmes finos de BaTiO<sub>3</sub> com ~20 nm apresentam a desvantagem de ter espessura insuficiente para alterar do trajeto do feixe. Miao *et al* (115) sintetizaram filmes de TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> por *dip-coating* com espessura das camadas entre os 97,3-110,9 nm e 17,4 nm para SiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>, respectivamente. Puzzo *et al* (85) e Pavlichenko *et al* (83) publicaram estudos de síntese de filmes de TiO<sub>2</sub> e SiO<sub>2</sub> com aplicabilidade para sensores de temperatura em que sintetizaram os filmes por *spin-coating* e a espessura destes variava entre 80 nm e 56 - 76 nm para TiO<sub>2</sub> e 80 - 118 nm e 287 nm para SiO<sub>2</sub>. Tendo em conta que nestes estudos a espessura dos filmes de TiO<sub>2</sub> apresenta espessuras superiores à do filme de BaTiO<sub>3</sub> utilizado anteriormente, decidiu-se repetir o procedimento fazendo 5 deposições seguidas deste material para obter um filme com uma espessura de ~100 nm. Com o mesmo objetivo as NPs de SiO<sub>2</sub> de 60 nm foram substituídas por NPs do mesmo material mas com cerca de 360 nm de diâmetro, optando-se por realizar apenas uma deposição pois esta já teria espessura suficiente para alterar a direção do feixe e com estas dimensões as NPs não entrariam nos poros do filme de BaTiO<sub>3</sub> (**Figura 38**).



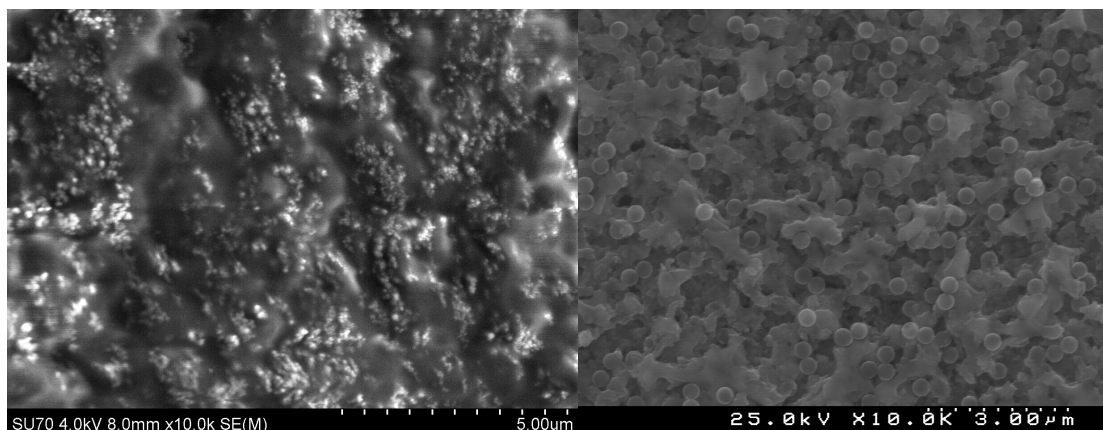
**Figura 38** - Representação esquemática da constituição do filme em multicamada constituído por 5 camadas de BaTiO<sub>3</sub> intercalado com NPs de SiO<sub>2</sub> com cerca de 360 nm de diâmetro.

Para averiguar se o filme apresentava a “*stopband*” característica do cristal fotónico sintetizado foi realizado o espectro UV/Vis da refletância difusa (**Figura 39**) do filme esquematizado anteriormente.



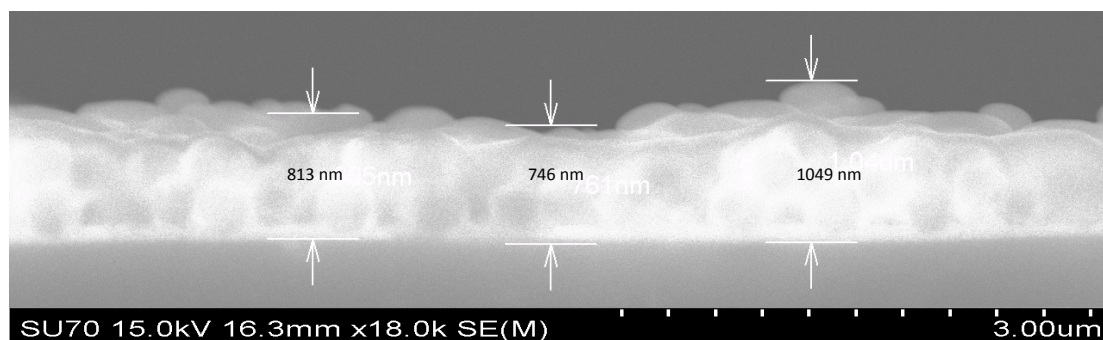
**Figura 39** - Espectro UV/Vis da refletância do filme de BaTiO<sub>3</sub> (~100 nm) intercalado com NPs de SiO<sub>2</sub> ~360 nm.

O espectro do filme apresenta o mesmo comportamento do vidro (branco) entre os 300 nm e os 800 nm refletindo cerca de 10% menos do que o vidro. A menor refletância na zona do visível demonstra que o filme promove a menor dispersão da luz, transmitindo mais. A única diferença observável entre o filme e o vidro encontra-se na região do ultravioleta entre os 250 nm e os 300 nm, não apresentando o vidro qualquer refletância nessa gama, sendo que o filme reflete entre 70 e 80 %. O facto de não aparecer nenhuma banda na zona do visível demonstra que o filme não apresenta as multicamadas esperadas. Na **Figura 40** está apresentada a imagem de SEM correspondente à superfície do filme de BaTiO<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub> obtido. Como é possível verificar este não apresenta uma camada superficial uniforme constituída por uma camada porosa de BaTiO<sub>3</sub> como esperado e esquematizado na **Figura 38** mas um aglomerado de BaTiO<sub>3</sub> com NPs de SiO<sub>2</sub>, confirmando a não individualização das camadas.



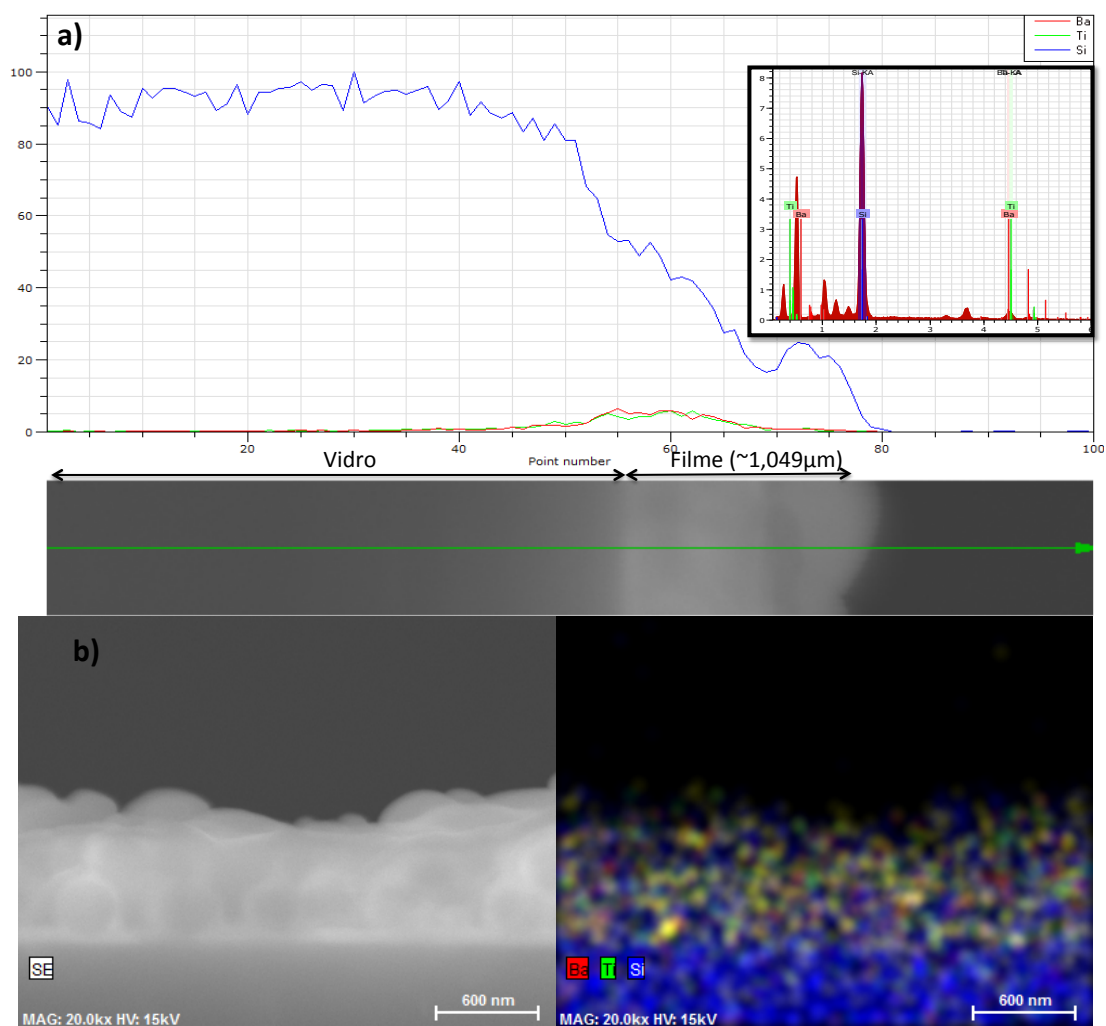
**Figura 40** – Microimagem de SEM à superfície do filme em multicamada constituído por BaTiO<sub>3</sub> (~100 nm) intercalado com NPs SiO<sub>2</sub> ~360 nm. Esquerda – filmes visualizados sem deposição de carbono; direita – filmes visualizados com uma camada de carbono depositada.

A imagem do filme em *cross section* apresentada na **Figura 41** confirma a aglomeração dos diferentes materiais fotónicos. O filme não apresenta um tamanho uniforme variando entre os 746 nm e 1049 nm. Na imagem é possível visualizar a presença das NPs no interior do filme que se encontram envolvidas pelo filme de BaTiO<sub>3</sub> como confirmado pelo perfil e mapa de elementos efetuado (**Figura 42b**).



**Figura 41** - Microimagem em *cross section* do filme de BaTiO<sub>3</sub> intercalado com NP SiO<sub>2</sub> com ~360 nm.

O EDS confirma a presença dos 3 elementos inorgânicos (Bário, Titânio e Silício) no filme e o perfil de elementos confirma que, de facto, não existem camadas intercaladas entre BaTiO<sub>3</sub> e SiO<sub>2</sub>. Assim, na **Figura 42a** a linha azul, correspondente ao SiO<sub>2</sub>, nunca intercepta a linha verde nem a vermelha correspondentes ao titânio e ao bário, respetivamente na zona onde se encontra o filme. As linhas correspondentes ao bário e ao titânio no filme são muito inferiores relativamente à linha de silício, mostrando que o filme é demasiado fino e o perfil traçado pela linha azul corresponde maioritariamente ao silício presente no vidro.

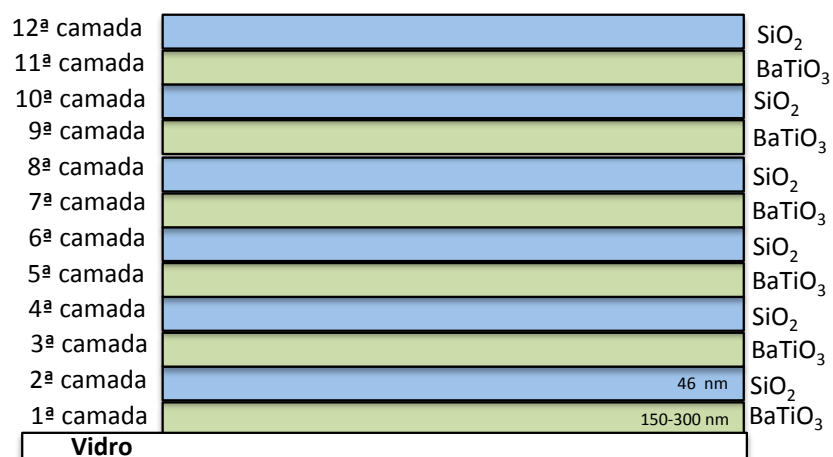


**Figura 42** – Distribuição de Ba, Ti e Si ao longo do filme de BaTiO<sub>3</sub> (~100 nm) intercalado com NPs de SiO<sub>2</sub> (~360 nm) em *cross section*: a) Perfil da distribuição dos compostos inorgânicos ao longo do filme e respectivo EDS; b) mapa de elementos do filme de BaTiO<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub>.

Uma vez que as NPs não permitem a formação uniforme da camada de SiO<sub>2</sub> optou-se por realizar um filme em multicamada de BaTiO<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub> usando um filme de SiO<sub>2</sub> para contornar os problemas associados ao uso de NPs. Miao *et al* (115) sintetizaram filmes de SiO<sub>2</sub> com ~46 nm e revestiram-nos com TiO<sub>2</sub>. Neste caso utilizou-se uma solução de BaTiO<sub>3</sub> que permitiu a obtenção de um filme com maior espessura, rondando os 150 nm ou 300 nm, quando depositado a 45 mm.min<sup>-1</sup> ou 96 mm.min<sup>-1</sup>, respetivamente. Este novo filme realizado é constituído por 12 camadas intercaladas entre BaTiO<sub>3</sub> e SiO<sub>2</sub> como esquematizado na **Figura 43**. Desta forma:

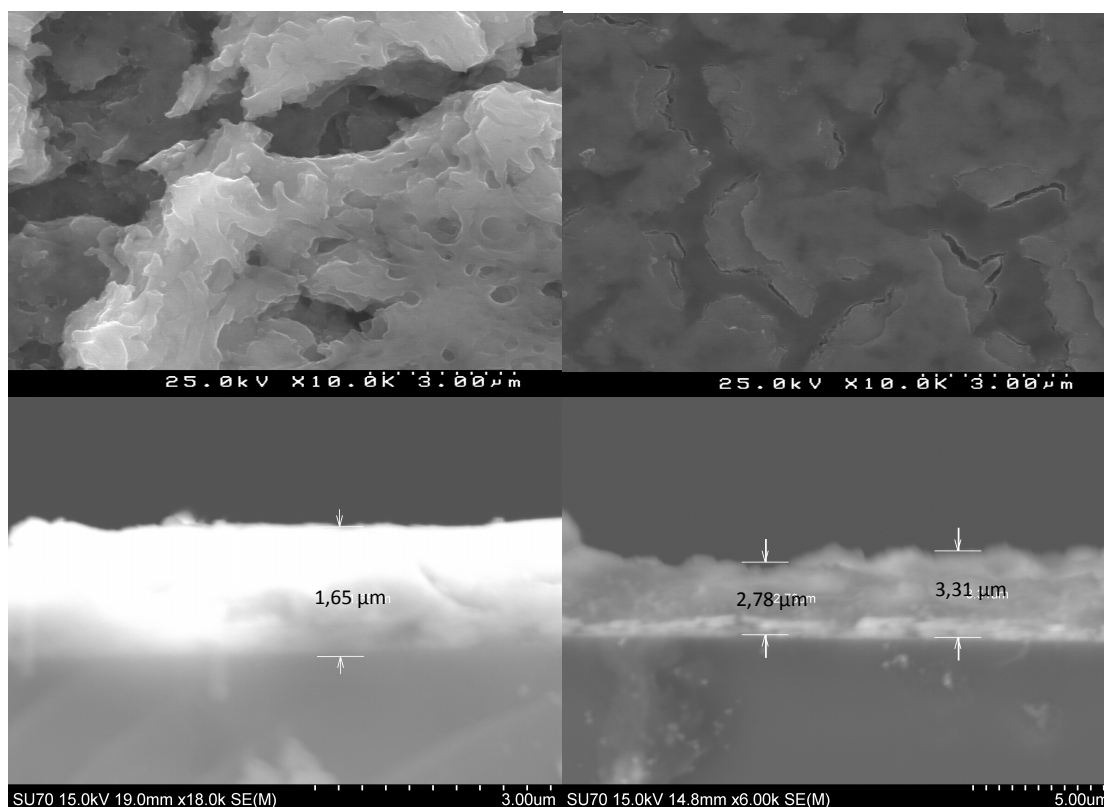
- 1) 150 nm (BaTiO<sub>3</sub>) x 6 (nº camadas) + 46 (SiO<sub>2</sub>) nm x 6 (nº camadas) = 1176 nm
- 2) 300 nm (BaTiO<sub>3</sub>) x 6 (nº camadas) + 46 (SiO<sub>2</sub>) nm x 6 (nº camadas) = 2076 nm ,

seria de esperar que os filmes apresentassem uma espessura total de 1176 nm e 2076 nm para o filme depositado a 45 mm.min<sup>-1</sup> e 96 mm.min<sup>-1</sup>, respetivamente.



**Figura 43** - Representação esquemática da constituição do filme em multicamada de BaTiO<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub>, usando um filme de SiO<sub>2</sub>.

Na **Figura 44** estão apresentadas as imagens de SEM dos filmes de BaTiO<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub> depositados a 45 mm.min<sup>-1</sup> (esquerda) e 96 mm.min<sup>-1</sup> (direita).

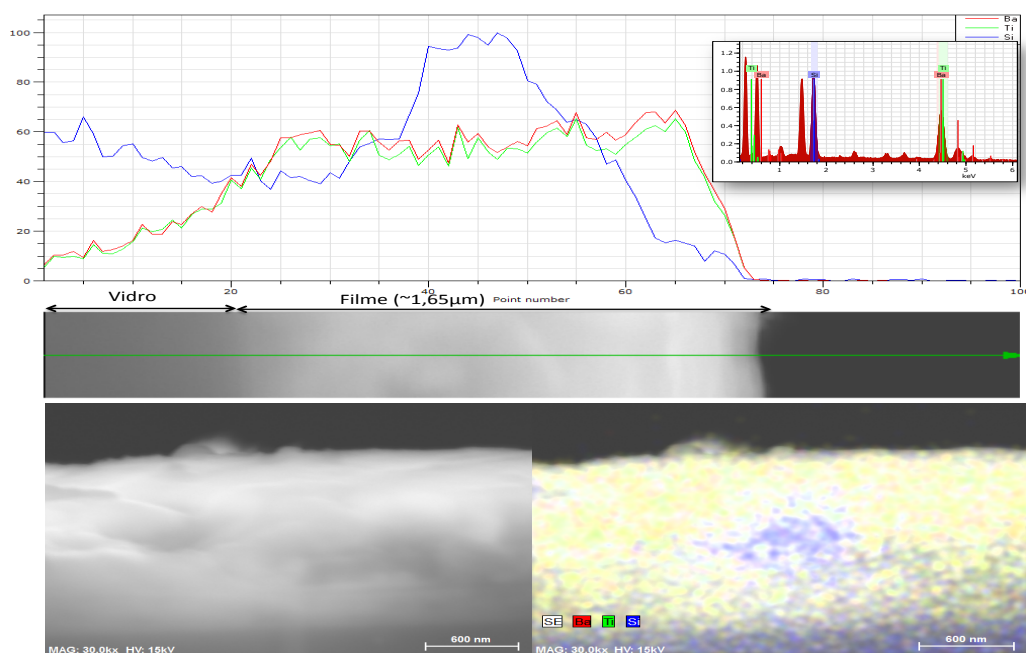


**Figura 44** - Microimagens de SEM do filme em multicamada usando BaTiO<sub>3</sub> e SiO<sub>2</sub>. Esquerda – 45 mm.min<sup>-1</sup> (no topo, imagem à superfície, na parte inferior, imagem em *cross section*); Direita – 96 mm.min<sup>-1</sup> (no topo, imagem à superfície, na parte inferior, imagem em *cross section*).

Tal como esperado é possível ver a partir das imagens dos filmes em *cross section* que o filme depositado a 96 mm.min<sup>-1</sup> (à direita) apresenta maior espessura que o filme depositado a 45 mm.min<sup>-1</sup> confirmando que a velocidade de deposição

interfere na espessura das camadas. Porém, ambos os filmes apresentam espessuras superiores ao esperado, tendo o filme depositado a menor velocidade cerca de 1650 nm. Dividindo a espessura total pelo número total de camadas depositadas, e assumindo que a espessura da camada de SiO<sub>2</sub>, se mantém com ~46 nm, resulta em camadas de BaTiO<sub>3</sub> com cerca de 229 nm de espessura. Contudo, tem-se em consideração que a espessura do filme de SiO<sub>2</sub> obtida depende do substrato onde este é depositado e da sua adesão ao mesmo, que neste caso foi o BaTiO<sub>3</sub> e não o vidro, podendo o filme de SiO<sub>2</sub> sintetizado não apresentar a mesma espessura que o apresentado por Miao *et al.* (115) O filme depositado a 96 mm.min<sup>-1</sup> não apresenta uma espessura uniforme - 2780 nm e 3310 nm - ambas superiores à espessura esperada (2076 nm). Fazendo o mesmo cálculo realizado para o filme anterior e usando como espessura total a menor das duas espessuras determinadas o filme deveria apresentar camadas de BaTiO<sub>3</sub> com ~417 nm cada. Contudo, e como verificado na **Figura 44**, não existe divisão das diferentes camadas em ambos os filmes. Assumindo que a camada de SiO<sub>2</sub> é de 46 nm, e que as camadas de BaTiO<sub>3</sub> estão mais espessas que o esperado e se sobrepuseram às de SiO<sub>2</sub>, essa pode ser a justificação para o efeito fotónico esperado não se ter verificado.

Para estes filmes foi igualmente realizado o perfil e mapa de elementos apresentados na **Figura 45** e **46** para o filme depositado a 45 mm.min<sup>-1</sup> e 96 mm.min<sup>-1</sup>, respetivamente.

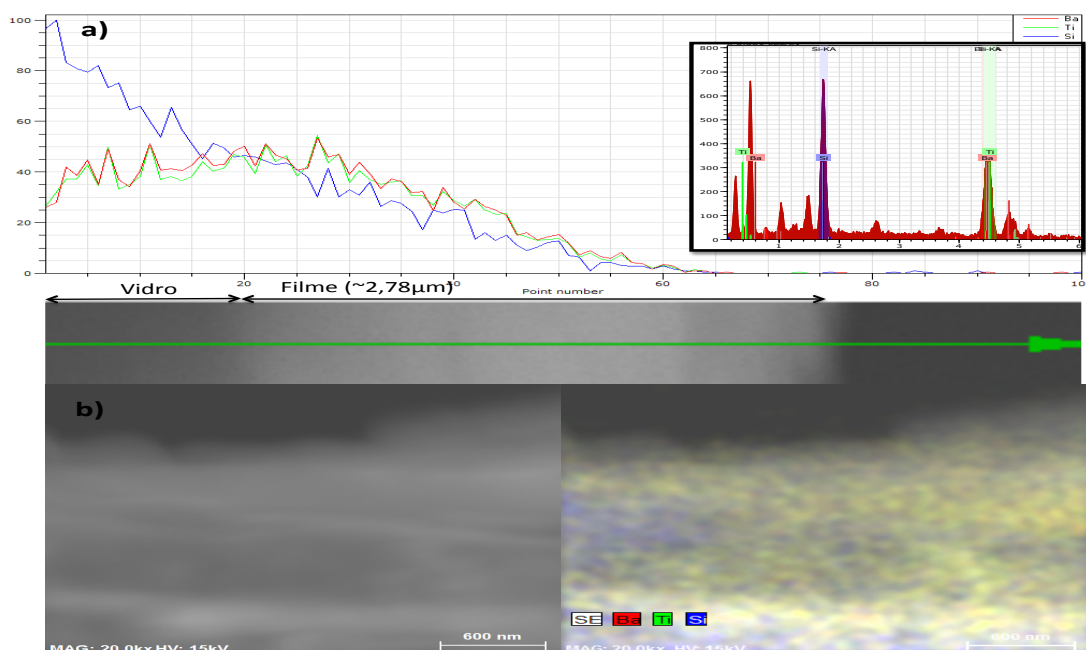


**Figura 45** - Distribuição de Ba, Ti e Si ao longo do filme de BaTiO<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub> depositado a 45 mm.min<sup>-1</sup> em *cross section*: a) Perfil da distribuição dos compostos inorgânicos ao longo do filme e respectivo EDS; b) mapa de elementos do filme de BaTiO<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub>.

A partir do perfil efetuado ao filme depositado a 45 mm.min<sup>-1</sup> verifica-se que existe separação das camadas de BaTiO<sub>3</sub> e SiO<sub>2</sub>. Na zona do filme as linhas a verde e vermelho correspondentes ao Bário e Titânio aparecem inicialmente bastante acima da linha azul correspondente ao silício, intersectando-a posteriormente e passando esta a predominar. No final do filme esta diminui passando as linhas do Bário e do Titânio a estar sobrepostas às do Si. No mapa de elementos efetuado (**Figura 45 b**) ) embora o Bário e Titânio apareçam por todo o filme analisado é possível ver uma zona central rica em silício (zona azul).

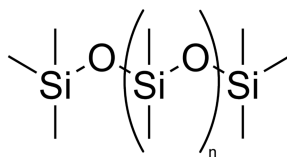
O mesmo perfil não é verificado para os filmes depositados a 96 mm.min<sup>-1</sup> (**Figura 46**) pois na zona do filme não há predominância de silício em nenhum ponto do filme, sendo as linhas vermelha e verde – Bário e Titânio – predominantes em todo o filme. Embora a imagem em *cross section* apresentada na **Figura 44** sugira a presença de camadas, o mapa de elementos realizado não mostra uma distribuição separada de Ba/Ti e Si.





**Figura 46** - Distribuição de Ba, Ti e Si ao longo do filme de BaTiO<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub> depositado a 96 mm.min<sup>-1</sup> em *cross section*: a) Perfil da distribuição dos compostos inorgânicos ao longo do filme e respetivo EDS; b) mapa de elementos do filme de BaTiO<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub>.

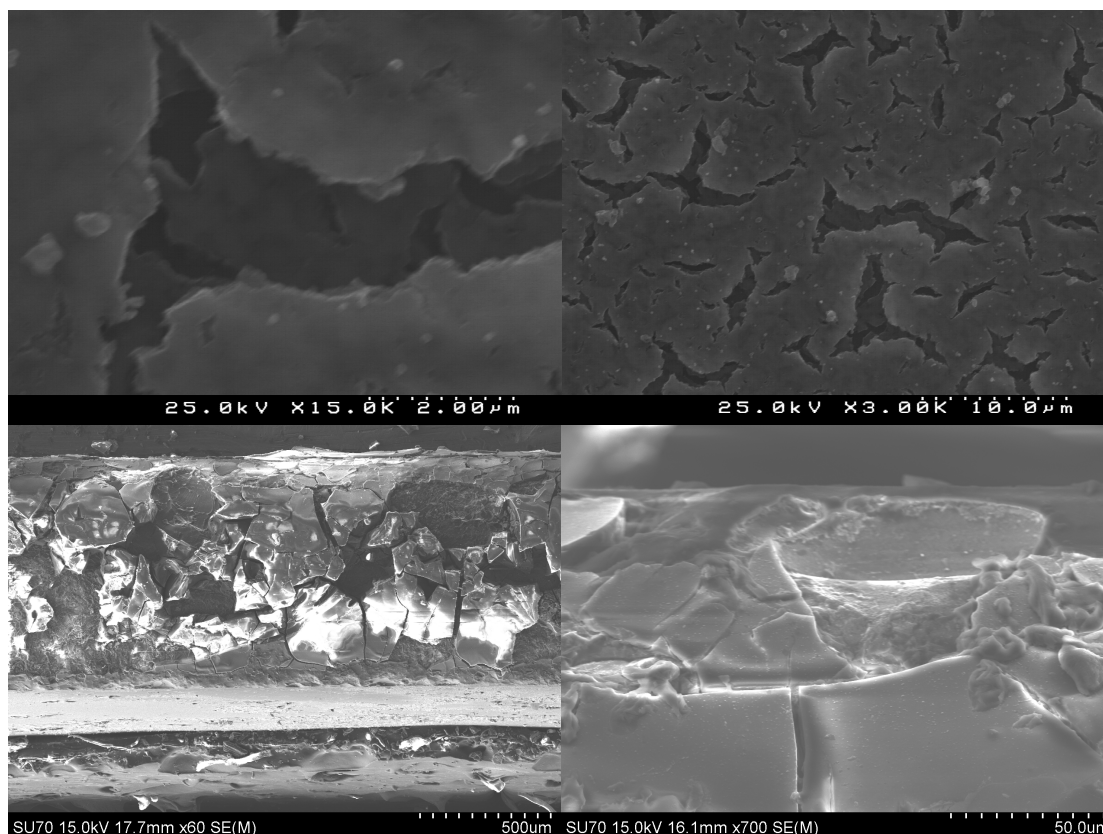
O objetivo da realização deste sensor de temperatura é a sua aplicação em embalagens de alimentos, sendo necessário, numa fase posterior, substituir o substrato de vidro por um substrato mais flexível e que permita a adesão à embalagem de plástico. O poli(dimetilssiloxano) (PDMS) é um polímero constituído por uma unidade repetitiva de (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiO estabilizada por unidades terminais de (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiO (**Figura 47**).



**Figura 47** - Estrutura do PDMS.

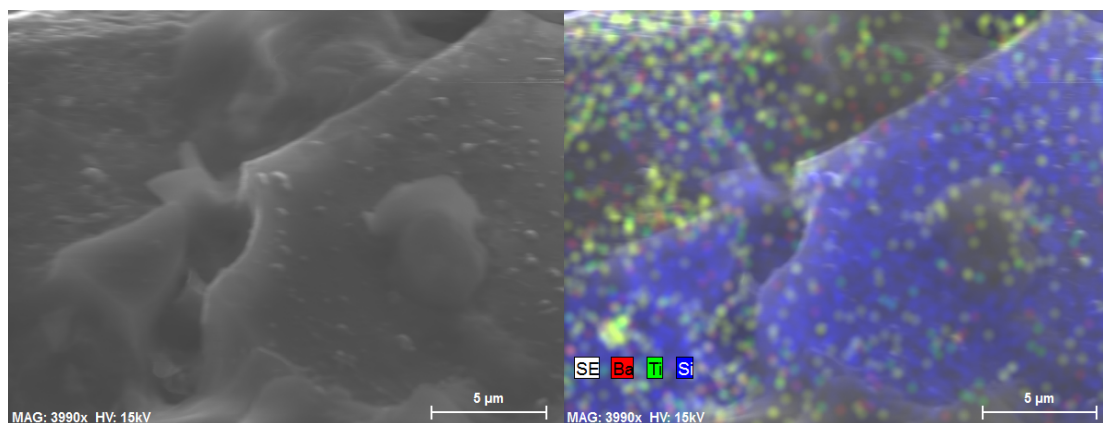
Este polímero é usado a nível industrial, por exemplo, na indústria alimentar em óleos de cozinha e alimentos processados, evidenciando a sua compatibilidade alimentar. O PDMS é um polímero constituído por silício que apresenta um índice de refração distinto do BaTiO<sub>3</sub>. Neste caso, foi sintetizado um filme com 6 camadas intercaladas de BaTiO<sub>3</sub>/PDMS. Na **Figura 48** estão apresentadas as imagens à superfície do filme (topo) e em *cross section* (inferior).





**Figura 48** - Imagens de SEM do filme em multicamada usando BaTiO<sub>3</sub> e PDMS. Topo – imagem à superfície, Inferior – imagem em *cross section*.

Aquando da realização do filme em camadas, o tetrahidrofurano da solução precursora do BaTiO<sub>3</sub> e calcinação das camadas de BaTiO<sub>3</sub> resultou na compressão e degradação do PDMS visível a olho nu e confirmada por observação no SEM (**Figura 48**). As imagens em *cross section* mostram que o PDMS torna o filme demasiado espesso alcançando a escala dos milímetros (1,053 mm) . Dada a espessura do PDMS e a potencial impregnação do BaTiO<sub>3</sub> através das fissuras do PDMS, não foi possível visualizar as camadas de BaTiO<sub>3</sub>. Esta observação foi confirmada pela análise do mapa de elementos (**Figura 49**) efetuada ao filme cuja distribuição de Bário e Titânio se encontra por todo o filme e se confirma que os blocos apresentados se devem ao PDMS (tonalidade azul correspondente ao silício).



**Figura 49** – Mapa de distribuição de Ba, Ti e Si ao longo do filme de BaTiO<sub>3</sub>/PDMS em *cross section*.

Assim, após todos os ensaios com vista à obtenção do sensor de temperatura conclui-se que a melhor combinação para a realização deste será a combinação entre BaTiO<sub>3</sub> e SiO<sub>2</sub> usando a velocidade de deposição a 45 mm.min<sup>-1</sup>. De facto, embora com estas condições não seja verificada a individualização das camadas pelas imagens de SEM, pelo perfil efetuado confirma-se a presença de pelo menos 3 camadas. Contudo é necessário obter camadas de SiO<sub>2</sub> com maior espessura para tentar atingir o efeito fotónico esperado.

## **5 Conclusões**



A primeira parte deste trabalho consistiu em estudar a estabilidade de diferentes saladas de fruta (S1, S2 e S3) relativamente à temperatura de pasteurização aplicada (80 e 70 °C) e à temperatura de armazenamento (4 e 25 °C). O tratamento térmico aplicado teve efeito imediato em algumas saladas reduzindo o teor de compostos fenólicos, influenciando a acidez e o pH e provocando o escurecimento das saladas. Ambas as pasteurizações foram eficientes na inativação enzimática impedindo a ação da PME e PG responsáveis pela perda de textura do fruto e da PPO e POD responsáveis pelo seu escurecimento. Uma vez que não se verificaram diferenças drásticas entre as duas temperaturas de pasteurização aplicadas, e que as saladas pasteurizadas a 70 °C se encontram microbiologicamente seguras, esta pasteurização a baixa temperatura poderá ser usada para o tratamento térmico das saladas de fruta, de forma a evitar os efeitos prejudiciais do uso de elevadas temperaturas.

Em relação à temperatura de armazenamento, houve inevitavelmente perda das propriedades bioativas das saladas de fruta, havendo perda de compostos fenólicos e da atividade antioxidante ao longo dos 56 dias. O armazenamento a 25 °C não teve influência relevante nos parâmetros físico-químicos avaliados, porém a nível organolético mostrou ter um forte impacto negativo. A cor das saladas de fruta foi afetada pela temperatura de armazenamento, pelo que estas apresentam pior classificação na análise sensorial relativamente às saladas de fruta armazenadas a 4 °C. As saladas de fruta devem ser armazenadas a 4 °C, podendo, contudo, ser mantidas a temperatura ambiente por aproximadamente 1 mês, mantendo-se estáveis a nível da cor. S3 não poderá ser mantida a 25 °C por ser constituída por antocianinas que, aquando da pasteurização foram degradadas pelo uso de elevadas temperaturas e induziram o escurecimento precoce da salada de fruta, potenciado pelo armazenamento a temperaturas mais altas.

As três saladas apresentam composição volátil distinta sendo S1 e S3 constituída maioritariamente por ácidos e S2 por compostos terpénicos. A composição volátil foi igualmente afetada pelo tratamento térmico e pelo armazenamento, tendo as saladas de fruta menos compostos voláteis após 56 dias de armazenamento relativamente à salada de fruta fresca. A temperatura de armazenamento também teve efeito no teor volátil das saladas de fruta tendo percentagem diferente relativamente às saladas frescas.

S2 demonstrou ser a salada de fruta mais estável, tendo sido a salada que sofreu menor escurecimento ao longo do armazenamento, apresenta uma percentagem reduzida de marcadores de Maillard e é a detentora de maior percentagem de compostos terpénicos na sua composição volátil. A nível sensorial S2 apresentou classificação positiva em todos os parâmetros avaliados.

S3 apresenta vários fatores a melhorar: os frutos usados não podem ser congelados, pois a congelamento afeta *a priori* a textura destes, e consequentemente a estabilidade das antocianinas que posteriormente vai condicionar a cor da salada.

Relativamente ao sensor de temperatura para embalagens alimentares, a sua síntese apresentou algumas dificuldades nomeadamente na obtenção dos filmes em multicamada constituídos por BaTiO<sub>3</sub> e SiO<sub>2</sub>. A não obtenção de camadas uniformes dos dois materiais fotónicos foi a maior dificuldade na síntese do filme esperado. Diversos métodos de síntese e materiais foram testados, começando pelo uso de TiO<sub>2</sub>, que foi posteriormente substituído por BaTiO<sub>3</sub>. O mesmo se sucedeu com o SiO<sub>2</sub> que foi usado na fase inicial na forma de NPs, primeiro com 60 nm e posteriormente com 360 nm. Estas não permitiram formar camadas individualizadas, sendo uma desvantagem e por essa razão foi testado o uso de filmes de SiO<sub>2</sub>. Mesmo assim o efeito fotónico esperado não foi atingido. As camadas dos diferentes materiais inorgânicos não apresentaram espessura suficiente para alterar o trajeto do feixe luminoso não havendo o aparecimento da cor. De salientar que a síntese de sensores para embalagens alimentares é uma área ainda pouco explorada e que requer tempos prolongados de otimização das condições experimentais. Este trabalho demonstrou que o uso de filmes em multicamada de BaTiO<sub>3</sub> e SiO<sub>2</sub> usando a velocidade de 45 mm.min<sup>-1</sup> foi a melhor condição com vista à obtenção do sensor de temperatura. Assim, todo este trabalho preliminar de síntese do sensor, permitiu o início de um processo de síntese de um sensor de temperatura que irá, numa fase posterior, resultar no desenvolvimento de um novo método para controlar a segurança alimentar de saladas de fruta.

## **6 Perspetivas Futuras**





- Melhoria das saladas de fruta:
  - Realização de novas saladas de fruta usando um índice de sólidos solúveis mais elevado ( $\sim 18$  °Brix) para ajudar na conservação destas, aumentando o seu tempo de vida. Índices de sólidos solúveis elevados são usados para conservação dos frutos em calda pois controlam a humidade dos frutos impedindo o crescimento microbiano;
  - Na salada de frutos vermelhos, substituir os frutos vermelhos congelados por frutos frescos, embora este recurso seja mais dispendioso na obtenção da material prima. Desta forma serão evitadas alterações de textura resultantes do congelamento dos frutos.
  - Outra forma de melhorar a textura e cor da salada de frutos vermelhos é o uso de frutos congelados, que já tenham sofrido algum processamento prévio ao congelamento, que evite a perda da textura.
  - Enriquecimento das saladas de fruta com soluções enriquecidas em cálcio, antes do processamento térmico, para melhorar a textura.
  
- Síntese do sensor de temperatura para embalagens alimentares:
  - Otimização dos filmes porosos de  $\text{TiO}_2$ .
  - Relativamente às nanopartículas em formato *core-shell* testar o uso de agentes surfactantes de forma a promover a adesão entre as camadas.
  - Nos filmes em multicamada adotar o uso de filmes não porosos de  $\text{TiO}_2$  e  $\text{SiO}_2$  com espessura de  $\sim 100$  nm.
  - Após a síntese do filme e obtenção da cor, testar o filme a diferentes temperaturas de forma a averiguar o seu efeito termo-óptico.
  - Testar o filme em substrato maleável (não de vidro) para que a sua aplicação em embalagens alimentares seja possível.



## **7 Referências bibliográficas**



1. WHO - World Health Organization. Disponível em: [http://www.who.int/elena/titles/fruit\\_vegetables\\_ncds/en/](http://www.who.int/elena/titles/fruit_vegetables_ncds/en/) (Acedido a 24 de Setembro de 2014).
2. Norat T, Aune D, Chan D, Romaguera D. Fruits and vegetables: updating the epidemiologic evidence for the WCRF/AICR lifestyle recommendations for cancer prevention. *Cancer treatment and research*. 2014;29:35-50.
3. Guy-Joseph L, Marc L, Serge TO, Bndicte N, Justine M. Evolution of biochemical and physical parameters of two fresh-cut fruits over storage at 4C. *African Journal of Food Science*. 2014;8(5):239-48.
4. Kongkachuichai R, Charoensiri R, Sungpuag P. Carotenoid, flavonoid profiles and dietary fiber contents of fruits commonly consumed in Thailand. *International journal of food sciences and nutrition*. 2010;61(5):536-48.
5. Araguez I, Valpuesta V. Metabolic engineering of aroma components in fruits. *Biotechnology journal*. 2013;8(10):1144-58.
6. Fernandes A, Santos, G. . Chemical and physicochemical characteristics changes during passion fruit juice processing. *Food Science*. 2011;31(3):747-51.
7. Makkumrai W, Anthon, GE, Sivertsen, H, Ebeler, SE, Negre-Zakharov F, Barret, DM. Effect of ethylene and temperature conditioning on sensory attributes and chemical composition of "Bartlett" pears. *Postharvest Biology and Technology*. 2014;97:44-61.
8. Perez-cacho PR, Rouseff, R. Processing and Storage Effects on Orange Juice Aroma: A Review. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;59:9785-96.
9. European commision derectorate-general for agriculture and rural development. *Agricultural commodity markets past developments: Fruits and vegetables*. 2007. Based on statistic from FAO.
10. IFT – Feeding the minds that feed the worlf. Consumers demand natural, fresh food. Disponível em: <http://www.ift.org/food-technology/daily-news/2013/september/18/consumers-demand-natural-fresh-food.aspx>. (visualizado a 9 de Julho de 2015).
11. Wansink B, Just, DR, Hanks, AS, Smith, LE. Pre-sliced fruit in school cafeterias: Children's selection and intake. *American Journal of Preventive Medicine*. 2013;44(5):477-80.
12. Cardoso WS, Pinheiro FA, Perez R, Patelli T, Faria EM. Desenvolvimento de uma salada de frutas: da pesquisa de mercado à tecnologica de alimento. *Ciência e tecnologia alimentar*. 2010;30(2):454-62.
13. FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Save Food - Global Initiative on Food Loss and Waste Rediction*. 2014.
14. Caronna S. *How to avoid food wastage: strategies for a more efficient food chain in the EU*. Committee on Agriculture and Rural Development, 2011.
15. Paul V, Pandey, R. Role of internal atmosphere on fruit ripening and storability - A review. *Journal of Food Science and Technology*. 2014;51(7):1223-50.
16. Bello-Pérez LA, Aparicio-Saguilán A, Méndez-Montealvo G, Solorza-Feria J, Flores-Huicochea E. Isolation and Partial Characterization of Mango (*Magnifera indica* L.) Starch: Morphological, Physicochemical and Functional Studies. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2005;60(1):7-12.

17. Simao R, Silva, A. Mango Starch Degradation. I. A Microscopic View of the Granule during Ripening. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56:7410-5.
18. Echavarría AP, Pagán J, Ibarz A. Melanoidins Formed by Maillard Reaction in Food and Their Biological Activity. *Food Engineering Reviews*. 2012;4(4):203-23.
19. Magaia T, Uamusse, A, Sjöholm, I, Skog, K. Dietary fiber, organic acids, and minerals in selected wild edible fruits of Mozambique. *SpringerPlus*. 2013;2(1):1-8.
20. Ramulu P, Udayasekhara Rao P. Total, insoluble and soluble dietary fiber contents of Indian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2003;16(6):677-85.
21. Liu P, Kallio H, Lu D, Zhou C, Ou S, Yang B. Acids, sugars, and sugar alcohols in Chinese hawthorn (*Crataegus* spp.) fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;58(2):1012-9.
22. Nile SH, Park SW. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*. 2014;30(2):134-44.
23. Spanos GA, Wrolstad, RE. Phenolics of Apple, Pear, and White Grape Juices and Their Changes with Processing and Storage-A Review. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1992;40:1478-87.
24. Acosta-Estrada BA, Gutierrez-Urbe JA, Serna-Saldivar SO. Bound phenolics in foods, a review. *Food chemistry*. 2014;152:46-55.
25. Malec M, Quéré J-M, Sotin H, Kolodziejczyk K, Bauduin R, Guyot S. Polyphenol profiling of a red-fleshed apple cultivar and evaluation of the color extractability and stability in the juice. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2014;62:6944-54.
26. Kovacevic DB, Levaj B, Dragovic-ezelac V. Free radical scavenging activity and phenolic content in strawberry fruit and jam. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2009;74(3):155-9.
27. Poiana M-A, Moigradean D, Dogaru D, Mateescu C, Raba D, Gergen I. Processing and storage impact on the antioxidant properties and color quality of some low sugar fruit jams. *Romanian biotechnological letters*. 2011;16(5):6504-12.
28. Ismail F, Talpur, F. N, Memon, AN. Determination of water soluble vitamin in fruits and vegetables marketed in Sindh Pakistan. *Pakistan Journal Nutrition*. 2013;12(2):197-9.
29. Rickman JC, Bruhn CM, Barrett DM. Nutritional comparison of fresh, frozen, and canned fruits and vegetables II. Vitamin A and carotenoids, vitamin E, minerals and fiber. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007;87(7):1185-96.
30. Bruckner B. Fruit and vegetable flavour: recent advances and future prospects. Woodhead publishing limited: Abington Hall Cambridge, UK. 2008.
31. El Hadi MA, Zhang FJ, Wu FF, Zhou CH, Tao J. Advances in fruit aroma volatile research. *Molecules*. 2013;18(7):8200-29.
32. Vrhovsek U, Lotti C, Masuero D, Carlin S, Weingart G, Mattivi F. Quantitative metabolic profiling of grape, apple and raspberry volatile compounds (VOCs) using a GC/MS/MS method. *Journal of chromatography B*. 2014;966:132-9.

33. Schwab W, Davidovich-Rikanati, R, Lewinsohn, E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*. 2008;54:712-32.
34. Goff SA, Klee HJ. Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value. *Science*. 2006;311:815-9.
35. Newman JD, Chappell, J. Isoprenoid biosynthesis in plants: Carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 1999;34:95-106.
36. Holland D, Larkov O, Bar-Yaákov I, Bar E, Zax A, Brandeis E. Developmental and varietal differences in volatile ester formation and acetyl-CoA: Alcohol acetyl transferase activities in apple (*Malus domestica* Borkh) fruit. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53:7198-203.
37. Villatoro C, Altisent R, Echeverria G, Graell J, Lopez ML, Lara I. Changes in biosynthesis of aroma volatile compounds during on-tree maturation of "Pink Lady" apples. *Postharvest Biology and Technology*. 2008;47:286-95.
38. Rapparini F, Predieri S. Pear fruit volatiles. *Horticultural reviews*. 2003;Ed. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA:237-324.
39. Obando-Ulloa JM, Moreno E, Garcia-Mas J, Nicolai B, Lammertync J, Monforte JA, et al. Climateric or non-climateric behavior in melon fruit. 1. Aroma volatiles. *Postharvest Biology and Technology*. 2008;49:27-37.
40. Bood KG, Zabetakis I. The biosynthesis of strawberry flavor (II): Biosynthetic and molecular biology studies. *Journal of food science*. 2002;67:2-8.
41. Gonzalez-mas MC, Rambla JL, Alamar MC, Antonio AG. Comparative analysis of the volatile fraction of fruit juice from different Citrus species. *Plos One*. 2011;6:e22016.
42. Pino JA, Mesa J. Contribution of volatile compounds to mango (*Mangifera indica* L.) aroma. *Flavor and fragrance journal*. 2006;21:207-13.
43. Dieguez SC, Lois LC, Gomez EF, De la Pena MLG. Aromatic composition of the *Vitis vinifera* grape Albariño. *Lebensmittel-Wissenschaft und-technologie*. 2003;36:585-90.
44. Klesk K, Qian M, Martin R. Aroma extract dilution analysis of cv. Meeker (*Rubus idaeus* L.) red raspberries from Oregon and Washington. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52:5155-61.
45. Du XF, Plotto A, Song M, Olmstead J, Rouseff R. Blueberry volatile composition of four southern highbush cultivars and effect of growing location and harvest date. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011;59:8347-57.
46. Ninio R, Lewinsohn E, Mizrahi Y, Sitrit Y. Quality attributes of storage kuobo (*cereus pervianus* (L.) Miller) fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 2003;30:273-80.
47. Akakabe Y, Sakamoto M, Ikeda Y, Tanaka M. Identification and characterization of volatile components of Japanese sour citrus fruit *Citrus nagato-yuzukichi* Tanaka. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*. 2008;72:1965-8.
48. Winterhalter P, Rouseff RL. Carotenoid-derived aroma compounds: An introduction. *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*; Winterhalter, P, Rouseff, R L, Eds American chemical society: Washington, DC, USA. 2002:1-17.
49. McGlasson WB, Wills RBH. Effects of oxygen and carbon dioxide on respiration, storage life, and organic acids of green bananas. *Australian Journal of Biology Science* 1972;25:35-42.

50. Posé S, Kirby AR, Mercado JA, Morris VJ, Quesada MA. Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruits using AFM. *Carbohydrates Polymers* 2012;88(3):882-90.
51. Sila D, Van Buggenhout S, Duvetter T, Fraeye I, Roeck A, Loey A, Hendrickx M. Pectins in processed fruits and vegetables, Part II: Structure-function relationships. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2009;8:86-104.
52. Terefe NS, Buckow R, Versteeg C. Quality-related enzymes in fruit and vegetable products: effects of novel food processing technologies, part 1: high-pressure processing. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2014;54(1):24-63.
53. Miedes E, Lorences EP. Changes in cell wall pectin and pectinase activity in apple and tomato fruits during *Penicillium expansum* infection. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006;86(9):1359-64.
54. Posé S, Paniagua C, Cifuentes M, Blanco-Portales R, Quesada MA. Insights into the effects of polygalacturonase FaPG1 gene silencing on pectin matrix disassembly, enhanced tissue integrity, and firmness in ripe strawberry fruits. *Journal of experimental botany*. 2013;64(12):3803-15.
55. Liu J, Cheng Y, Peng S. Effects of calcium treatment on calcium forms, pectin content and related enzyme activities in harvested pear fruits. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*. 2005;13:408-12.
56. Tomas-Barberan FA, Espin JC. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of Science and Food Agriculture*. 2001;81:853-76.
57. Ramaswamy H, Riahi E. High-pressure inactivation kinetics of polyphenol oxidase in apple juice. *Applied Biotechnology Food Science and Policy*. 2003;1:189-97.
58. Van Buggenhout S, Sila DN, Duvetter T, Van Loey A, Hendrickx M. Pectins in processed fruits and vegetables: Parte III. Texture engineering *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2009;8:105-17.
59. Morant AV, Jorgensen K, Jorgensen C, Paquette SM, Sbnchez-Pqrez R, Moller BL. Beta-glucosidase as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry*. 2008;69:1795-813.
60. Rodrigo D, Jolie R, Loey A. Handrickx, M. Thermal and high pressure stability of tomato lipooxygenase and hydroperoxide lyase. *Journal of Food Engeneering*. 2007;79:423-9.
61. Soliva-Fortuny RC, Oms-Oliu G, Martin-Belloso. Effects of ripeness stages on the storage atmosphere, color, and textural properties of minimally processed Apple slices. *Journal of Food Science*. 2002;67:1958-63.
62. Supapvanich S, Tucker G. A. Physicochemical changes in fresh-cut Honeydew melon fruit during storage. *African Journal of Agricultural Research*. 2011;6(12):2737-42.
63. Da Paepe D, Valkenburg D. Thermal degradation of cloudy Apple juice phenolic constituents *Food chemistry*. 2014;162:176-85.
64. Corrêa Neto R, Faria J. Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. *Ciência e tecnologia alimentar*. 1999;19(1):153-61.
65. Randhir R, Kwon Y-I, Shetty K. Effect of thermal processing in phenolics, antioxidant activity and health-relevant functionality of select grain sprouts and seedlings. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2008;9:355-64.



66. Van Boekel MA. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology advances*. 2006;24(2):230-3.
67. Hsu HY, Tsai YC, Fu CC, Wu JS. Degradation of Ascorbic Acid in ethanolic solutions. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2012;60(42):10696-701.
68. Chuang PT, Shen SC, Wu JS. Browning in ethanolic solutions of ascorbic acid and catechin. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011;59(14):7818-24.
69. Rickman JC, Barrett DM, Bruhn CM. Nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Part 1. Vitamins C and B and phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007;87(6):930-44.
70. Wrolstad RE, Durst RW, Lee J. Tracking color and pigment changes in anthocyanins products. *Trends in Food Science and Technology*. 2005;16:423-8.
71. Skrede G, Wrolstad RE, Durst RW. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of food science*. 2000;65:357-64.
72. Nogales-Delgado S, Fuentes-Pérez M, Bohoyo-Gil D. Cultivar characterization of stone fruits for their minimal processing. *Journal of Food Science and Technology*. 2013.
73. Villa-Rodriguez J, Palafox-Carlos H, Yahia E, Ayala-Zavala J, Gonzalez-Aguilar G. Maintaining antioxidant potential of fresh fruits and vegetables after harvest. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2015;55:806-22.
74. Realini C, Marcos, B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Science*. 2013;98:404-19.
75. Dainelli D, Gontard, N., Spyropoulos, D. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science and Technology*. 2008;19:103-12.
76. Yam KL, Takhistov, P. T., Miltz, J. Intelligent Packaging: Concepts and Applications. *Journal of Food Science*. 2005;70:1-10.
77. Lagaron JM, Labedo, L. . Increasing packaged food quality and safety: (ii) nanocomposites. *Food additives and contaminants*. 2005;22(10):994-8.
78. Wu A, Beack C, Ying Y, Federici J, Iqbal Z. Thermochromism in Polydiacetylene-ZnO Nanocomposites. *The Journal of Physical Chemistry* 2013;117:19693-00.
79. Warwick M, Binions R. Advances in thermochromic vanadium dioxide films. *Journal of Materials Chemistry A*. 2014;2:3275-92.
80. Wacharasindhu S, Montha S, Boonyiseng J, Potisatityuenyong A, Phollookin C, Tumcharern G. Tuning of Thermochromic Properties of Polydiacetylene toward Universal Temperature Sensing Materials through Amido Hydrogen Bonding. *Macromolecules*. 2010;43(2):716-24.
81. Kang L, Gao Y, Luo H. A novel solution process for the synthesis of VO<sub>2</sub> thin films with excellent thermochromic properties. *Applied Materials and Interfaces*. 2009;1:2211-8.
82. Dhawan A, Sharma Y, Brickson L, Muth J. Incorporation of vanadium oxide films in optical fibers for temperature sensing and optical. *Optical Materials Express*. 2014;4.
83. Pavlichenko I, Exner AT, Guehl M, Lugli P, Scarpa G, Lotsch BV. Humidity-Enhanced thermally tunable TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> Bragg Stacks. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2012;116:298-305.

84. Wang H, Zhang K-Q. Photonic crystal structures with tunable structure color as colorimetric sensors. *Sensors*. 2013;13:4192-213.
85. Puzzo DP, Bonifacio LD, Oreopoulos J, Yip CM, Manners I, Ozin GA. Color from colorless nanomaterials: Bragg reflectors made of nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* 2009;19:3500-6.
86. Zhao Y, Xie Z, Gu H, Zhu C, Gu Z. Bio-inspired variable structural color materials. *Chemistry Society Reviews*. 2012;41:3297-317.
87. Ozin G, Arsenault AC. P-Ink and Elast-Ink from lab to market. *Materials Today*. 2008;11:44-51.
88. Joannopoulos JD, Johnson SG, Winn JN, Meade RD. Photonic crystals: Molding the flow of light. 2nd ed. Princeton University Press: Princeton, NJ 2008.
89. Mills A, Wang J, Crow M, Taglioni G, Novella L. Novel low-temperature photocatalytic titania films produced by plasma-assisted reactive dc magnetron sputtering. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2007;187:370-6.
90. Pilkington - Selfcleaning Pilkington Activ™- Disponível em: <http://www.pilkington.com/products/bp/bybenefit/selfcleaning/default.htm> (acedido a 1 de junho de 2015).
91. Global partnership site - Hydrotect. Disponível em: <http://www.toto.co.jp/hydrotect/top03.html> (acedido a 1 de Junho de 2015).
92. Hebalkar NY, Acharya S, Rao TN. Preparation of bi-functional silica particles for antibacterial and self cleaning surfaces. *Journal of colloid and interface science*. 2011;364:24-30.
93. Liu C, Gao G, Zhang Y, Wang L, Wang J, Song Y. The naked-eye detection of NH<sub>3</sub>-HCl by polyaniline-infiltrated TiO<sub>2</sub> inverse opal photonic crystals. *Macromolecular rapid communications*. 2012;33:380-5.
94. Galagan Y, Su, W. F. Fadable ink for time-temperature control of food freshness: Novel new time.temperature indicator. *Food Research International*. 2008;41(6):653-7.
95. Mehauden K, Cox PW, Bakalis, S. A novel method to evaluate the applicability of time temperature integrators to different temperature profiles. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2007;8:507-14.
96. Zhang B-Y, Samapundo S, Pathakos V, Baenst I, Surengil G, Nosedá B. Effect of atmosphere combining high oxygen and carbon dioxide levels on microbial spoilage and sensory quality of fresh-cut pineapple. *Postharvest Biology and Technology*. 2013;86:73-84.
97. Chaikham P, Apichartsrangkoon A, Seesuriyachan P. Physical and biochemical qualities of pressurized and pasteurized longan juice upon storage. *Food science and nutrition*. 2014;26(3):218-28.
98. Corporation WB. Worthington enzyme manual. Enzymes and related biochemicals. 1993;Bedford: Millipore Corporation:293-4.
99. Berke B, Freitas V. A colorimetric study of oenin copigmented by procyanidins. *Journal of Science and Food Agriculture*. 2007;87(2):260-5.
100. Echavarría AP, Pagán J, Ibarz A. Kinetics of color development of melanoidins formed from fructose/amino acid model systems. *Food science and technology international*. 2014;20(2):119-26.
101. Babsky NE, Toribio JL, Lozano JE. Influence of storage on the composition of clarified apple juice concentrate. *Journal of Food Science*. 1986;51(3):564-7.

102. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidant by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*. 1999;299.
103. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannal A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical Biology and Medicine*. 1999;26(9-10):1231-7.
104. Chira K, Jourdes M, Teissedre PL. Cabernet sauvignon red wine astringency quality control by tannin characterisation and polymerisation during storage. *European Food Research and Technology*. 2012;234(2):253-61.
105. de Freitas V, Glories Y, Bourgeois G, Vitry C. Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry. *Phytochemistry*. 1998;49(5):1435-41.
106. Burns J, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, McPhail DB. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000;48(2):220-30.
107. Plummer DT. In: *An introduction to practical biochemistry*. 2nd ed. London: McGraw-Hill; 1978. p. 144-5.
108. Guldas M. The determination of ascorbic acid, chlorophyll and pectin contents of Turkish kiwifruit. *Journal of food quality*. 2003;26:353-8.
109. Nunes C, Coimbra MA, Saraiva J, Rocha MA. Study of the volatile components of a candied plum and estimation of their contribution to the aroma. *Food chemistry*. 2008;111:897-905.
110. Zhang Q, Zhang T, Ge J, Yin Y. Permeable silica shell through surface-protected etching. *Nanoletters*. 2008;8(9):2867-71.
111. Lee J-W, Kong S, Kim W-S, Kim J. Preparation and characterization of SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> core-shell particles with controlled shell thickness. *Materials Chemistry and Physics*. 2007;106:39-44.
112. Castro A, Morère J, Cabañas A, Ferreira LP, Godinho M, Ferreira P. Chemical designed multiferroic nanocomposite films: a Proof of concept. submitted. 2015.
113. Castro A. *Conceção de filmes finos mesoporosos multifuncionais para aplicações tecnológicas*.: Universidade de Aveiro; 2015.
114. Rao KS, El-Hami K, Kodaki T, Matsushige K, Makino K. A novel method for synthesis of silica nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*. 2005;289:125-31.
115. Miao L, Su LF, Tanemura S, Fisher CAJ, Zhao LL, Liang Q, et al. Cost-effective nanoporous SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> coatings on glass substrates with antireflective and self-cleaning properties. *Applied Energy*. 2013;112:1198-205.
116. Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*. 2004;11(7):36-42.
117. Santos MI, Correia C, Cunha MIC, Saraiva MM, Novais MR. Valores guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge - INSA; Centro de Segurança Alimentar e Nutrição - CSAN.
118. Marquez A, Sarratosa M, Varo MA, Merida J. Effect of temperature on the anthocyanin and color evolution during controlled dehydration of tempranillo grapes. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2014;62:7897-902.

119. Czibulva Z, Kollár L, Nikfardiam MP, Kunsági-Máté S. The effect of temperature on the color of red wines. *Journal of food science*. 2012;880-5.
120. Santos M, Nunes C, Rocha MA, Rodrigues A, Rocha S, Saraiva J. Impact of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free white wine during bottle storage: Evidence for Maillard reaction acceleration. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2013;20:51-8.
121. Rivas A, Rodrigo D, Martínez A, Barbosa-Cánovas GV, Rodrigo M. Effect of PEF and heat pasteurization on the physical-chemical characteristics of blended orange and carrot juice. *Food science and technology*. 2005;1-8.
122. BeMiller JN, Kumari GV. b-elimination in uronic acids: evidence for an ElcB mechanism. *Carbohydrates Research*. 1972;25:419-28.
123. Abers JE, Wrolstad RE. Causative factors of color determination in strawberry preserves during processing and storage. *Journal of food science*. 1979;44:75.
124. Cornwell CJ, Wrolstad RE. Causes of browning in pear juice concentrate during storage. *Journal of food science*. 1981;46:515.
125. Borrelli R, Visconti A, Mennella C, Anese M, Fogliano V. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of food chemistry*. 2002;50:6527-33.
126. Munyaka AW, E. ME, Oey I, Van Loey A, Hendrickx M. Thermal stability of L-ascorbic acid and ascorbic acid oxidase in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Journal of food science*. 2010;75(4):C336-40.
127. Rivera-Lopez J, Vazquez-Ortiz FA, Ayala-Zavala JF, Sotelo-Mundo RR, Gonzalez-Aguilar GA. Cutting shape and storage temperature affect overall quality of fresh-cut papaya cv. 'Maradol'. *Journal of food science*. 2005;70(7):482-9.
128. Caleb OJ, Fawole OA, Mphahlele RR, Opara UL. Impact of preharvest and postharvest factors on changes in volatile compounds of pomegranate fruit and minimally processed arils - Review. *Scientia Horticulturae*. 2015;188:106-14.
129. Gandy AL, Schilling MW, Coggins PC, White CH, Yoon Y, Kamadia VV. The effect of pasteurization temperature on consumer acceptability, sensory characteristics, volatile compound composition, and shelf-life of fluid milk. *Journal of dairy science*. 2008;91:1769-77.
130. Voon YY, Hamid N, Rusul G, Osman A, Quek SY. Volatile flavour compounds and sensory properties of minimally processed durian (*Durio zibethinus* cv. D24) fruit during storage at 4°C. *Postharvest Biology and Technology*. 2007;46:76-85.
131. Lu P-F, Qiao H-L, Xu Z-C, Cheng J, Zong S-X, Luo Y-Q. Comparative analysis of peach and pear fruit volatiles attractive to the oriental fruit moth, *Cydia molesta*. *Journal of plant interactions*. 2014;9(1):388-95.
132. Verzera A, Dima G, Tripodi G, Condurso C, Crinò P, Romano D, et al. Aroma and sensory quality of honeydew melon fruits (*Cucumis melo* L. subsp. *melo* var. *inodorus* H. Jacq.) in relation to different rootstocks. *Scientia Horticulturae*. 2014;169:118-24.
133. Munafo JP, Didzbalis J, Schnell RJ, Schieberle P, Steinhaus M. Characterization of the major aroma-active compounds in Mango (*Mangifera indica* L.) cultivars haden, white alfonso, praya sowoy, royal special, and Malindi

by application of a comparative aroma extract dilution analysis. Journal of agricultural and food chemistry. 2014;62:4544-51.

134. Agila A, Barringer S. Effect of roasting conditions on color and volatile profile including HMF level in sweet almonds (*Prunus dulcis*). Institute of food technologists. 2012;77(4):C461-C8.

135. Santos M, Nunes C, Cappele J, Gonçalves FJ, Rodrigues A, Saraiva J. Effect of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free red wine. Food chemistry. 2013;141:2558-66.

136. Jankiewicz BJ, Jamiola D, Choma J, Jaroniec M. Silica-metal core-shell nanostructures. Advances in colloid and interface science. 2012;170:28-47.

137. APC - International, Ltd. Piezoelectricity. <http://www.americanpiezo.com/knowledge-center/piezo-theory/piezoelectricity.html> (acedido a 25 de Junho de 2015).

138. Nakata K, Sakai M, Ochiai T, Maurakami T, Takagi K, Fujishima A. Antireflection and self-cleaning properties of a moth-eye-like surface coated with TiO<sub>2</sub> particles. Langmuir. 2011;27:3275-8.





-

## **8 Anexos**





## ANEXO I

	Registo		
	Provas Sensoriais		
Marlita Nobre	QUA 051 R02		22.06.15

Produto: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Nome: \_\_\_\_\_

Assinale com X os valores de 1 a 4 que correspondem às características do produto.

Lote	Data de Produção	Aroma				Sabor				Amargor				Cor				Textura				Acidez				Observações
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	

1-Não Aceitável; 2-Aceitável; 3- Bom; 4-Muito Bom. No caso de atribuir classificação 1 e 2, justifique.

Figura 50 - Folha de prova para análise sensorial.

## ANEXO II

**Tabela 8** - Composição volátil total presente nas saladas S1 frescas (NP) e pasteurizadas e armazenadas durante 56 dias a 4 e 25 °C. Resultados expressos em área de integração - (x10<sup>5</sup>).

S1				
ALDEÍDOS				
	TR	Área de integração (x10 <sup>5</sup> )		
		NP	4°C	25°C
Hexanal	6,28	62,2	nd	nd
Heptanal	18,94	7,4	nd	nd
Nonanal	23,8	5,5	nd	nd
Nonenal	31,7	31,6	nd	nd
Trans-2-nonenal	31,83	12,6	nd	nd
Trans-2,cis-6-nonadienal	34,68	51,3	nd	nd
Benzaldeído	35,99	nd	9,9	5,8
	Área total	170,6	9,9	5,8
OUTROS COMPOSTOS				
	TR	Área de integração (x10 <sup>5</sup> )		
		NP	4°C	25°C
Hexano	1,79	nd	92,2	nd
Etil benzeno	18,8	nd	12,3	nd
Estragole	39,72	44,9	nd	nd
Benzeno	41,7	nd	11,3	nd
2,5-ciclohexanodieno	50,75	19,8	nd	nd
	Área total	64,7	115,8	nd
ÁCIDOS				
Área de integração (x10 <sup>5</sup> )				

	TR	NP	4°C	25°C
Ácido acético	2,13	126,8	234,2	362,6
Ácido butanoico	9,91	141,1	nd	150,9
Ácido-2-butenóico	12,71	102,9	10,4	50,7
Ácido butírico	37,43	5,2	nd	nd
Ácido benzoico	39,54	14,4	nd	nd
Ácido decadienoico	48,35	nd	2,2	nd
Área total		390,4	246,8	564,2

#### ÁLCOOIS

	Área de integração (x10 <sup>5</sup> )			
	TR	NP	4°C	25°C
Etanol	2,68	108,9	88,8	101,2
Butan-1-ol	7,79	30,5	83,7	55,6
Butenol	9,68	34,4	nd	nd
2-metil-butan-1-ol	16,14	nd	21,2	nd
Hexen-3-ol	23,1	2,1	nd	nd
Decanol	41,46	nd	2,8	nd
Benzenometanol	47,33	5,4	nd	nd
Álcool benzílico	47,57	nd	0,5	nd
Área total		181,3	197	156,8

#### COMPOSTOS TERPÊNICOS

	Área de integração (x10 <sup>5</sup> )			
	TR	NP	4°C	25°C
Alfa-pineno	4,8	10	nd	nd
Delta-3-carene	8,21	712,2	258,6	253,9
Alfa-felandreno	8,42	54,9	nd	nd
Sabineno	9,34	13,3	nd	nd
Limoneno	10,71	22	nd	nd
Alfa-terpinoleno	15,73	23	6,7	nd
Cariofileno	34,06	4,3	nd	nd
Carvona	40,41	2,7	nd	nd
Alfa-farneseno	43,73	129,5	19,9	nd
Metil-eugenol	52,02	22,4	nd	nd
Etil miristato	52,35	8,6	nd	nd
Eugenol	57,05	16,5	nd	nd
Área total		1019,4	285,2	253,9

#### ÉSTERES

	Área de integração (x10 <sup>5</sup> )			
	TR	NP	4°C	25°C
Butirato de Metilo	3,51	112,8	nd	nd
Butanoato de Etilo	4,78	328,5	241,2	nd
Etil-2-metilbutirato	5,23	10,5	nd	nd
Acetato de Butilo	6,01	238,5	109,1	113,6
Metil-2-metilbutanoato	6,11	nd	323,6	nd
Ciclopropano de etilo	7,2	11,5	nd	nd
2-metilbutilacetato	10,81	nd	16,4	nd
n-hexilacetato	16,09	174,8	29,05	nd
cis-3-hexenilacetato	18,8	5	nd	nd

<b>Formato de hexilo</b>	21,4	224,4	nd	nd
<b>Butirato de hexilo</b>	24,8	12,8	nd	nd
<b>Etil-3-hidroxibutirato</b>	31,13	5,6	nd	nd
<b>cis-3-hexenilisobutirato</b>	31,83	nd	14,8	nd
<b>Furfurilacetato</b>	32,57	1,9	nd	nd
<b>Octilformato</b>	33,62	5,6	3,6	nd
<b>3-hexenil-2-butanoato</b>	39,21	nd	33	nd
<b>Etil-2,4-(E,Z)-dicadienoato</b>	46,49	24	15,8	nd
<b>4-hidroxi-metilbenzoato</b>	48,56	nd	3,2	nd
<b>Área total</b>		1155,9	789,75	113,6

#### CETONAS

	TR	Área de integração (x10 <sup>5</sup> )		
		NP	4°C	25°C
<b>Dimetoxiciclopropanona</b>	10,14	nd	8,1	nd
<b>Acetoina</b>	16,96	3,6	nd	nd
<b>6-metil-5-hepten-2-ona</b>	20	21,9	nd	nd
<b>2,4-cicloheptendien1-ona</b>	50,75	19,8	nd	nd
<b>Área total</b>		45,3	8,1	nd

#### FURANOS

	TR	Área de integração (x10 <sup>5</sup> )		
		NP	4°C	25°C
<b>Furfural</b>	32,41	nd	nd	14,8
<b>Hidroximetilfurfural</b>	35,49	nd	nd	89,1
<b>2-furanometanol</b>	39,93	3,6	nd	nd
<b>Furanona</b>	53,32	nd	4,2	nd
<b>Área total</b>		3,6	4,2	nd

TR – tempo de retenção; nd- não detetados

### ANEXO III

**Tabela 9** - Composição volátil total presente nas saladas S2 frescas (NP) e pasteurizadas e armazenadas durante 56 dias a 4 e 25°C. Resultados expressos em área de integração - (x10<sup>5</sup>).

S2				
ALDEÍDOS				
	TR	Área de integração (x10 <sup>5</sup> )		
		NP	4°C	25°C
<b>Octanal</b>		20,1	nd	nd
<b>Área total</b>		20,1	0	0
ÁCIDOS				
	TR	Área de integração (x10 <sup>5</sup> )		
		NP	4°C	25°C
<b>Ácido acético</b>	3,05	272,8	9,2	285,9
<b>Ácido butanoico</b>	5,52	34,4	15,4	285,9
<b>Ácido-2-butenóico</b>	13,23	100,3	nd	nd
<b>Acido propanoico</b>	35,58	nd	nd	71,8
<b>Área total</b>		407,5	24,6	643,6
OUTROS COMPOSTOS				

	TR	Área de integração (x10 <sup>5</sup> )		
		NP	4°C	25°C
<b>Benzeno</b>	27,28	nd	56,2	nd
<b>Ciclohexeno</b>	40,88	nd	86,8	nd
	Área total	0	143	0
<b>ÁLCOOIS</b>				
	TR	Área de integração (x10 <sup>5</sup> )		
		NP	4°C	25°C
<b>Etanol</b>	3,81	362,5	71,5	372,4
<b>Octanol</b>	35,18	nd	21,6	nd
	Área total	362,5	93,1	372,4
<b>COMPOSTOS TERPÊNICOS</b>				
	TR	Área de integração (x10 <sup>5</sup> )		
		NP	4°C	25°C
<b>α-pineno</b>	9,52	74,1	35,1	n.d
<b>δ-3-carene</b>	11,3	440,2	n.d	418,8
<b>β-pineno</b>	12,33	n.d	n.d	210,3
<b>β-mirceno</b>	12,55	391,7	50,5	n.d
<b>Limoneno</b>	14,27	14937,8	4545,7	13554,2
<b>α-felandreno</b>	14,87	90,5	n.d	n.d
<b>α-terpinoleno</b>	19,22	3,9	n.d	48,2
<b>δ-3-carene</b>	37,03	208,9	64,8	282,3
<b>γ-terpineno</b>	39,06	57,1	66,3	196,7
<b>β-felandreno</b>	42,56	81,4	n.d	409,2
	Área total	16285,6	4762,4	15119,7
<b>ÉSTERES</b>				
	TR	Área de integração (x10 <sup>5</sup> )		
		NP	4°C	25°C
<b>Butanoato de etilo</b>	7,24	n.d	n.d	304,2
<b>Isoamilacetato</b>	10,89	81,5	n.d	n.d
<b>Hexanoato de etilo (caproato)</b>	17,1	nd	n.d	230,4
<b>n-Hexilacetato</b>	22,55	n.d	n.d	31
<b>3-metiltio propanoato de metilo</b>	32,92	n.d	16,9	n.d
<b>Octilformato</b>	37,42	n.d	n.d	73,5

TR – tempo de retenção; nd- não detetados

## ANEXO IV

**Tabela 10** - Composição volátil total presente nas saladas S3 frescas (NP) e pasteurizadas e armazenadas durante 56 dias a 4 e 25°C. Resultados expressos em área de integração - (x10<sup>5</sup>).

<b>S3</b>				
<b>ALDEÍDOS</b>				
	TR	Área de integração (x10 <sup>5</sup> )		
		NP	4°C	25°C
<b>Caproaldeido</b>	9,05	278,8	nd	21,1
<b>2-Hexenal</b>	16,46	136,1	nd	nd
<b>Heptanal</b>	23,18	56,5	nd	41,7

<b>Benzaldeído</b>	37,03	118,6	3,5	40,1
	Área total	590	3,5	102,9
<b>OUTROS COMPOSTOS</b>				
	<b>TR</b>	<b>Área de integração (x10<sup>5</sup>)</b>		
		<b>NP</b>	<b>4°C</b>	<b>25°C</b>
N-etil-1,3-ditioisindolina	2,76	nd	3,5	nd
Ciclotrisiloxano	3,13	nd	9	nd
Cloroformio	6,66	nd	7,7	nd
1,3-pentadieno	23,93	nd	36,6	nd
5-dimetilhexadieno	32,17	nd	nd	2,7
4-alilanisolestragole	41,66	53,1	16,5	nd
Benzeno	41,7	nd	nd	6
cis-8-metilbiciclonon-3-eno	42,56	nd	nd	8,6
1-metoxi-benzeno	46,39	nd	nd	2,1
	Área total	53,1	73,3	19,4
<b>ÁCIDOS</b>				
	<b>TR</b>	<b>Área de integração (x10<sup>5</sup>)</b>		
		<b>NP</b>	<b>4°C</b>	<b>25°C</b>
Ácido acético	3,48	83,6	49	9
Ácido butanoico	7,22	nd	80,3	8,3
Ácido-2-butenóico	13,3	nd	32,8	nd
Ácido benzoico	41,58	nd	4	5,5
Ácido hexadienoico	54,46	nd	1,5	nd
	Área total	83,6	167,6	22,8
<b>ÁLCOOIS</b>				
	<b>TR</b>	<b>Área de integração (x10<sup>5</sup>)</b>		
		<b>NP</b>	<b>4°C</b>	<b>25°C</b>
Etanol	4,31	67,9	nd	43,9
Propanol	5,24	nd	7,6	nd
Hexan-1-ol	9,1	nd	60,2	nd
Butan-1-ol	10,85	246,6	66,2	49,7
2-Metil-butan-1-ol	16,19	nd	4,4	7,8
Heptan-2-ol	23,2	nd	67,5	nd
3-Hexen-1-ol	25,35	nd	673,6	nd
2-Hexen-1-ol	28,63	nd	20,3	nd
6-Metil-5-hepten-2-ol	32,17	27,4	nd	nd
Octanol	37,06	nd	9	nd
Álcool benzílico	47,36	nd	nd	0,6
Benzenometanol	47,58	nd	3,8	nd
Fenol	50,44	nd	2,5	nd
	Área total	341,9	915,1	102
<b>COMPOSTOS TERPÊNICOS</b>				
	<b>TR</b>	<b>Área de integração (x10<sup>5</sup>)</b>		
		<b>NP</b>	<b>4°C</b>	<b>25°C</b>
Limoneno	14,16	153,6	11,7	7,4
δ-3-carene	37,03	118,6	53,6	40,1
γ-terpineno	41,85	nd	2,8	nd
g-terpineno	42,57	nd	2,8	nd

<b><math>\alpha</math>-farneseno</b>	44,03	22,6	3,9	nd
<b><math>\alpha</math>-ionona</b>	46,75	99,7	65,7	nd
<b>geranolacetona</b>	46,92	nd	nd	1,8
<b><math>\beta</math>-ionona</b>	48,86	97,2	54,3	40,6
<b>beta-bisaboleno</b>	51,02	12,4	nd	nd
	Área total	504,1	194,8	89,9
<b>ÉSTERES</b>				
	<b>TR</b>	<b>Área de integração (x10<sup>5</sup>)</b>		
		<b>NP</b>	<b>4°C</b>	<b>25°C</b>
<b>Butirato de etilo</b>	7,2	67,9	nd	26,9
<b>Acetato de butilo</b>	8,71	435,6	500,3	264,4
<b>2-metilbutilacetato</b>	10,91	nd	341	nd
<b>Amilacetato</b>	13,31	47,5	55,5	6,8
<b>Hexanoato de metilo</b>	14,52	nd	30,4	nd
<b>Butirato de butilo</b>	16,39	nd	7	nd
<b>Butil-2-metilbutanoato</b>	17,01	26,4	nd	nd
<b>Butil-2-metilbutirato</b>	17,16	nd	7,4	nd
<b>Hexanoato de etilo (caproato)</b>	17,42	47,2	120,6	nd
<b>n-hexilacetato</b>	19,97	632,8	424,8	62,9
<b>Formato de hexilo</b>	25,37	940,9	nd	523,1
<b>Butirato de hexilo</b>	29,52	31,3	nd	nd
<b>Cinamato de etilo</b>	53,03	nd	2,2	nd
	Área total	2229,6	1489,2	884,1
<b>CETONAS</b>				
	<b>TR</b>	<b>Área de integração (x10<sup>5</sup>)</b>		
		<b>NP</b>	<b>4°C</b>	<b>25°C</b>
<b>Heptanona</b>	14,32	nd	6,1	nd
<b>6-metil-5-hepten-2-ona</b>	24,06	nd	15,6	nd
<b>Acetofenona</b>	41,06	nd	nd	5,8
<b>Etanona</b>	41,08	nd	4,2	nd
<b>Butanona</b>	46,27	nd	nd	2,7
<b>3-buten-2-ona</b>	46,76	nd	nd	42,3
	Área total	0	25,9	50,8
<b>FURANOS</b>				
	<b>TR</b>	<b>Área de integração (x10<sup>5</sup>)</b>		
		<b>NP</b>	<b>4°C</b>	<b>25°C</b>
<b>Furfural</b>	32,41	nd	nd	28,2
<b>2,5-dimetil-4-metoxi-(2H)furanona</b>	38,98	nd	5,9	nd
<b>Furanona</b>	53,33	82,6	66,7	45,4
<b>Hidroximetilfurfural</b>	59,8	nd	nd	2,1
	Área total	82,6	72,6	75,7

TR – tempo de retenção; nd- não detetados

## ANEXO V

**Tabela 11** - Compostos de Maillard resultantes do tratamento térmico a 70 °C efetuado às saladas S1, S2 e S3 após 56 dias de armazenamento a 4 e 25°C. HMF – 5-Hidroximetilfurfural. (1 réplica)

<b>Área de integração (x10<sup>5</sup>)</b>				
		<b>Benzaldeído</b>	<b>Furfural</b>	<b>HMF</b>
<b>S1</b>	<b>NP</b>	nd	nd	nd
	<b>4°C</b>	nd	nd	nd
	<b>25°C</b>	5,78	14,8	89,1
<b>S2</b>	<b>NP</b>	nd	nd	nd
	<b>4°C</b>	nd	nd	nd
	<b>25°C</b>	nd	2,09	3,86
<b>S3</b>	<b>NP</b>	nd	nd	nd
	<b>4°C</b>	nd	nd	nd
	<b>25°C</b>	2,09	29,0	2,09

nd- não detetados

